



*Università degli Studi di Cagliari*

*Dottorato di Ricerca*

*in*

*Terapia Pediatrica e Farmacologia dello Sviluppo*

*XXIV Ciclo*

*Sviluppo di vettori virali per la terapia genica  
della  $\beta$ -Talassemia*

Settore scientifico disciplinare di afferenza

*[MED/38]*

**Presentata da:**

**Dott.ssa Annalisa Cabriolu**

**Coordinatore Dottorato**

**Prof. Renzo Galanello**

**Tutor/Relatore**

**Prof. Paolo Moi**

*Esame finale anno accademico 2010 - 2011*

## INDICE

<b>Premessa.....</b>	<b>3</b>
<b>Introduzione.....</b>	<b>4</b>
<i>L'emoglobina: struttura ed espressione ontogenetica.....</i>	<i>4</i>
<i>Struttura dei geni globinici.....</i>	<i>7</i>
<i>Strategie terapeutiche per la cura della talassemia.....</i>	<i>10</i>
<i>La terapia genica.....</i>	<i>13</i>
<i>Vettori lentivirali: classificazione.....</i>	<i>15</i>
<i>Lentivirus: morfologia e ciclo replicativo.....</i>	<i>16</i>
<i>Lentivirus come vettori.....</i>	<i>20</i>
<i>Terapia genica della <math>\beta</math>-talassemia tramite vettori lentivirali.....</i>	<i>23</i>
<b>Scopo della tesi.....</b>	<b>25</b>
<b>Materiali.....</b>	<b>29</b>
<b>Metodi.....</b>	<b>30</b>
<b>Risultati.....</b>	<b>43</b>
<b>Discussione.....</b>	<b>50</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>52</b>

## Premessa

La ricerca sulle malattie genetiche sta progredendo rapidamente e questi progressi si traducono in miglioramenti evidenti del quadro clinico dei malati. Ciononostante, a causa della natura stessa delle malattie genetiche, le terapie hanno spesso un successo solo parziale riuscendo a risolvere solo alcune delle conseguenze delle patologie.

Anche le terapie per la cura delle talassemie negli ultimi anni hanno fatto passi da gigante. Progressi continui nella terapia emo-trasfusionale e nella terapia ferrochelante hanno portato notevoli miglioramenti sia nella durata che nella qualità di vita dei soggetti talassemici, così che oggi tale malattia può essere considerata a “prognosi aperta” e proiettata verso la guarigione se la terapia “convenzionale” viene effettuata in modo ottimale fin dai primi anni di vita [Borgogna-Pignatti 2004]. Ciononostante la malattia impone tuttora continui sacrifici ai pazienti e ai familiari e rappresenta un carico pesante per la società e il sistema di assistenza sanitaria nazionale. Al momento l'unica arma terapeutica in grado di risolvere alla radice la malattia è rappresentata dal trapianto di midollo osseo. Questa pratica terapeutica offre buone prospettive di guarigione per i pazienti che ricevono il trapianto da un fratello donatore. Purtroppo c'è solo una possibilità su quattro che un dato fratello abbia un sistema di istocompatibilità identico, con una probabilità per un paziente talassemico di avere un donatore compatibile variabile in rapporto al numero dei componenti della famiglia.

Poiché la maggior parte dei pazienti talassemici non ha un fratello compatibile, si sta cercando di utilizzare donatori non familiari ma compatibili. Sfortunatamente, le complicanze legate al trapianto usando donatori compatibili non familiari sono

generalmente molto più alte di quelle riscontrate fratelli compatibili. Si spera che con i continui miglioramenti nelle tecniche di compatibilità, le complicanze saranno ridotte a livelli accettabili. Negli ultimi anni si sono avuti risultati molto incoraggianti con questo tipo di trapianti, anche se la casistica è limitata [Dini 2002, La Nasa 2005, Feng 2006] Per la restante popolazione di talassemici l'unica speranza di remissione della malattia è riposta nella probabilità di trovare un donatore compatibile non correlato nella banca di midollo osseo mondiale. Il 60% della popolazione di talassemici, essendo priva di un donatore correlato o non correlato, non ha attualmente speranze di guarigione definitiva. Questa categoria di soggetti ripone ogni speranza di cura definitiva nello sviluppo di terapie alternative.

## INTRODUZIONE

### L'emoglobina: struttura ed espressione ontogenetica

Le talassemie sono un gruppo di disturbi ereditari che comprendono un'eterogenea varietà di difetti a carico dei geni globinici che si traducono in più o meno gravi anomalie nella sintesi dell'emoglobina (Hb).

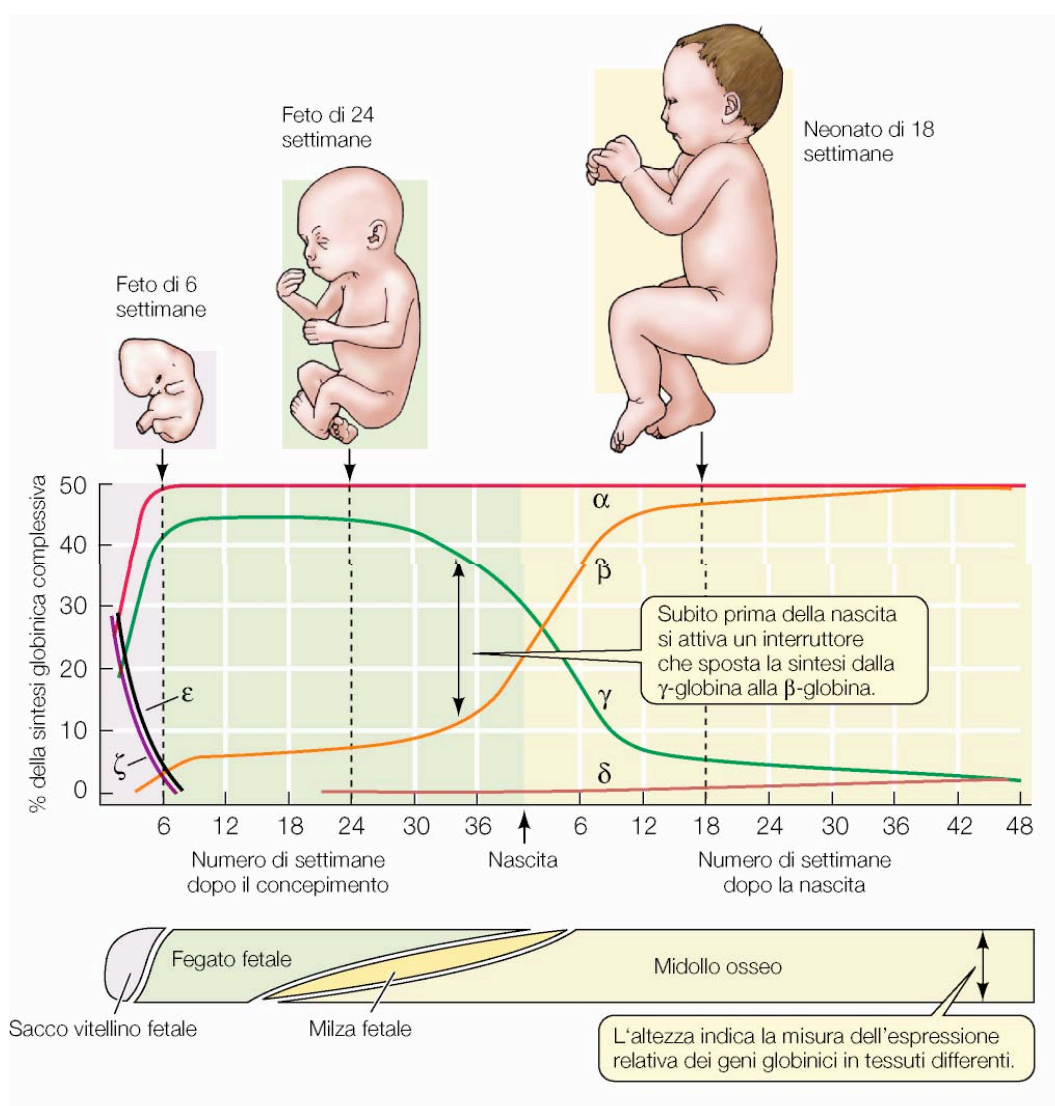
La molecola emoglobinica è una cromo-proteina tetramerica presente nei globuli rossi la cui funzione fondamentale è il trasporto dell'ossigeno dagli alveoli polmonari verso i tessuti.

L'emoglobina è costituita da due etero dimeri, ciascuno dei quali è composto da una catena polipeptidica di tipo  $\alpha$  ( $\zeta$  e  $\alpha$ ) e da una catena non- $\alpha$  ( $\epsilon$ ,  $\gamma^G$ ,  $\gamma^A$ ,  $\delta$   $\beta$ ) legate ad un anello protoporfirinico detto eme. Le catene  $\alpha$  sono composte da 141 residui aminoacidici mentre le catene non- $\alpha$  da 146 residui.

Durante le varie fasi dello sviluppo si possono identificare diverse forme di emoglobina dovute all'attivazione e allo spegnimento dei diversi geni globinici, questo fenomeno prende il nome di switching emoglobinico. Anche i tessuti deputati all'ematopoiesi variano a seconda dello stadio di sviluppo ontogenetico. Nel periodo embrionale l'ematopoiesi avviene nel sacco vitellino e determina la produzione dell'emoglobina di GowerI ( $\zeta_2\epsilon_2$ ) ed dei due ibridi GowerII ( $\alpha_2\epsilon_2$ ) e Portland ( $\alpha_2\gamma_2$ ) che compaiono con l'attivarsi dei geni  $\alpha$  e  $\gamma$ . Mentre durante il periodo fetale il tessuto deputato all'ematopoiesi diventa il fegato con la produzione di emoglobina fetale o HbF ( $\alpha_2\gamma_2^A$  e  $\alpha_2\gamma_2^G$ ) che in questo periodo rappresenta circa il 90% dell'emoglobina totale. Nelle prime settimane dopo la nascita la sintesi di  $\gamma$ -globine si riduce bruscamente e aumenta la sintesi di catene  $\beta$ . Verso il 6° mese di vita il

profilo emoglobinico adulto è completo e l'ematopoiesi è definitivamente spostata nel midollo osseo.

Mentre i geni del cluster alfa sono sottoposti ad un unico intervento di switch durante lo sviluppo, i geni del cluster beta ne subiscono più di uno, anche dopo la nascita [Grosveld 1993]. Come si vede in [Figura 1](#) la produzione di HbF diminuisce progressivamente dopo la nascita, fino ad essere sostituita quasi completamente dalla produzione delle emoglobine adulte.



**Figura 1** - Espressione tempo e tessuto-specifica delle diverse catene emoglobiniche umane. (tratta da: *Biologia L'informazione e l'eredità*. Savada, Orians, Heller; Zanichelli 2005)

## Struttura dei geni globinici

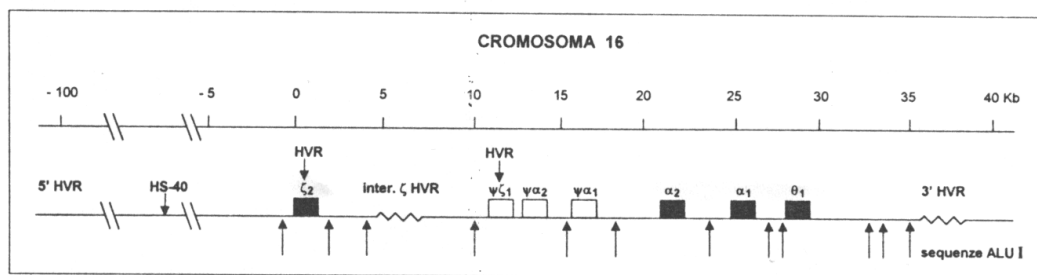
Ogni catena globinica è prodotta sotto il controllo di un suo gene strutturale che ne regola l'espressione. Nell'uomo i geni globinici sono raggruppati in clusters ed ogni singolo cluster è costituito sia da geni strutturali attivi dal punto di vista trascrizionale, sia da pseudogeni, o copie di geni, che con l'evoluzione hanno perso la propria capacità funzionale.

Tutti i geni globinici hanno una struttura simile che rivela la loro comune origine. [Bianco Silvestroni 1998].

- Ogni gene ha tre regioni codificanti, gli esoni, e due regioni intercalari, gli introni o IVS (InterVening Sequence) di lunghezza diversa per ogni gene globinico.
- Inoltre alle estremità 5' e 3' di tutti i geni globinici sono presenti delle regioni chiamate UTR che pur essendo trascritte non vengono tradotte.
- All'estremità 5' presentano tutti una regione promoter indispensabile per una corretta ed efficace trascrizione del gene.

Mentre nei pesci e nelle rane i geni del cluster  $\alpha$  e quelli del cluster  $\beta$  sono localizzati nello stesso cromosoma, nei mammiferi e negli uccelli sono situati in cromosomi differenti [Orkin 1995].

Nell'uomo il cluster  $\alpha$ , lungo circa 30Kb, si trova in una regione del DNA particolarmente ricca in GC (60%) nella porzione distale del braccio corto del cromosoma 16 (Figura 2). È costituito da tre geni funzionali, rappresentati dal gene  $\zeta$ , espresso in fase embrionale, e dai geni  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$  e tre pseudogeni denominati  $\psi\zeta$ ,  $\psi\alpha_1$ ,  $\psi\alpha_2$ . I geni  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$ , quasi perfettamente identici, si differenziano solo a livello del II introne (sostituzione di una base e delezione di sette basi nel gene  $\alpha_2$ ) e a livello del III esone, nella regione fiancheggiante 3'UTR, (sostituzione di diciotto basi e delezione di una base sempre nel gene  $\alpha_2$ ).

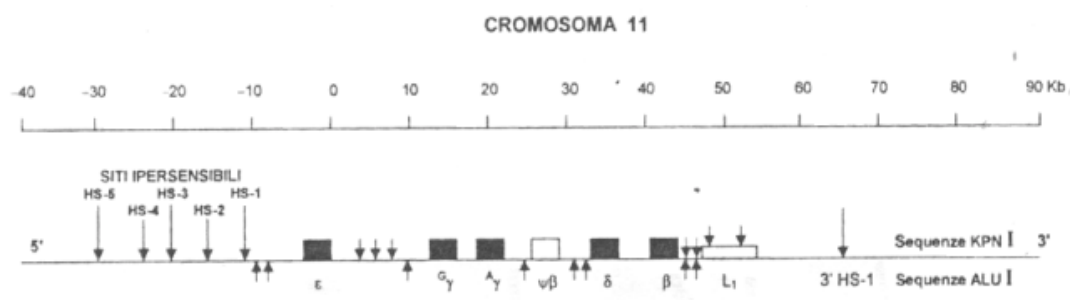


**Figura 2- Rappresentazione schematica del cluster  $\alpha$**

Infine, pur producendo polipeptidi identici, l'mRNA prodotto dal gene  $\alpha_2$  è circa 2,6 volte maggiore di quello sintetizzato da  $\alpha_1$  [Myers 1986]. Lungo tutto il cluster  $\alpha$  sono presenti sequenze ripetitive della famiglia Alu I (dal nome dell'enzima di restrizione che le identifica) e sequenze ricche in GC dette regioni HRV (High Variability Region) o minisatelliti.

Il complesso dei geni del cluster  $\beta$  è invece situato sul braccio corto del cromosoma 11 (Figura 3), comprende circa 70 kb e contiene sette geni globinici: i geni strutturali  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\beta$ , e gli pseudogeni  $\psi\beta 1$  e  $\psi\beta 2$  [Efstratiadis 1980]

L'espressione del cluster  $\beta$ -globinico è regolata dalle sequenze promotrici poste in 5' rispetto ai singoli geni ma anche da una regione regolatrice, delle dimensioni di circa 25 Kb, costituita da una serie di siti ipersensibili alla DNasiI, HS o Hypersensitive Sites, i quali sono riconosciuti da quattro fattori eritro-specifici (5' HS1-4), tra cui i più importanti sono GATA e NF-E2 e da un fattore ubiquitario (5' HS-5) [Bianco Silvestroni 1998].



**Figura 3- Disposizione dei geni globinici del cluster  $\beta$  nel cromosoma 11**



Tale regione, localizzata tra 6 e 8 Kb a monte del gene per le  $\epsilon$ -globine, è chiamata Locus Control Region (LCR). La sua sequenza è fondamentale per l'attivazione della trascrizione: un'eventuale delezione di tale regione comporta l'inibizione dell'espressione di tutte le proteine codificate dai geni contenuti nel cromosoma 11, provocando la  $\beta$ -talassemia [Jane 1992].

Regioni del tipo LCR sono state identificate in almeno 36 loci di mammifero di differenti specie, inclusi l'uomo, il topo, il ratto, il coniglio e la capra [Harju 2002].

Le ricerche più recenti suggeriscono che l'LCR funzioni come un olocomplesso di tutti gli HS, che interagisce con un solo gene globinico alla volta a seconda dello stadio di sviluppo eritroide regolando finemente lo switching dell'emoglobina. Infatti gli studi sulle modalità di azione dell'LCR, ci hanno portato alla conclusione che frammenti di HS, singoli o in combinazione, non riescono a raggiungere i livelli di attività dell'LCR integro. Inoltre, l'LCR agisce sinergicamente con il promotore dei singoli geni  $\beta$ -globinici e con l'apparato dell'RNA polimerasi per controllare nel tempo il progressivo "spegnimento" di alcune catene a favore di altre [Qiliang 2002]. Alcuni studi dimostrano che l'LCR è in grado di dirigere l'espressione globinica attraverso la formazione di loop di DNA, la cui formazione è dovuta all'interazione di complessi multipli DNA-proteina con i singoli promotori globinici. Le interazioni tra LCR e geni globinici sono finemente regolate e sono influenzati sia dalla posizione dei geni nel cluster [Hanscombe 1991, Dillon 1997] e dai fattori di trascrizione specifici, che a turno intervengono a seconda dello stadio di sviluppo

## **Strategie terapeutiche per la cura della talassemia**

I pazienti  $\beta$ -talassemici possono essere trattati seguendo due approcci fondamentali: la terapia convenzionale e il trapianto di midollo osseo.

La terapia convenzionale, basata sull'impiego di emotrasfusioni periodiche e di una aggressiva terapia ferrochelante, ha portato a un notevole prolungamento della sopravvivenza dei pazienti con talassemia che oggi possono anche raggiungere età superiori ai 40-45 anni, ma non ha abolito il rischio di morte e tanto meno ha raggiunto l'obiettivo guarigione. Gli effetti collaterali di questa terapia sono notevoli per le grandi quantità di ferro introdotte con le trasfusioni che si depositano a livello di organi quale cuore, fegato e ghiandole. Per eliminare i depositi di ferro in eccesso è quindi necessaria una terapia ferrochelante che per tanto tempo ha coinciso con l'impiego della Deferoxamina, ad uso esclusivo parenterale, e da pochi anni si avvale dell'impiego di altri due farmaci ad uso orale, il Deferasirox e il Deferiprone, che hanno migliorato notevolmente l'aderenza alla terapia e soprattutto, nel caso del Deferiprone, ridotto il danno miocardico.

L'altro approccio è quello del trapianto di midollo osseo che, in presenza di un donatore compatibile, può portare alla guarigione completa. I rischi per il paziente non sono irrilevanti e questa terapia richiede una valutazione dei rischi correlati alla possibilità di rigetto del midollo e alla terapia chemioterapica che il paziente deve subire.

Accanto a queste terapie convenzionali nel tentativo di identificare nuove terapie alternative, sono stati esplorati alcuni approcci.

Partendo dall'osservazione che il quadro clinico di pazienti con  $\beta$ -Talassemia e Drepanocitosi è attenuato dalla produzione di elevati livelli di emoglobina fetale molti studi sono stati volti ad esaminare sistemi per stimolarne la produzione.

Durante gli ultimi 15 anni sono stati identificati parecchi composti che stimolano la sintesi di emoglobina fetale come ad esempio gli agenti citossici, l'eritropoietina, ed i derivati dell'acido butirrico. I risultati complessivi indicano che questo tipo di approccio è indicato soprattutto per pazienti con talassemia intermedia o con  $\beta$ -Talassemia/HbF mentre in pazienti talassemici trasfusione-dipendente i risultati sono purtroppo deludenti.

Un'altro approccio per la risoluzione definitiva della  $\beta$ -Talassemia è rappresentato dalla terapia genica che si propone di sviluppare sistemi in grado modificare geneticamente le cellule sostituendo il gene difettoso con una copia che funzioni correttamente.

La terapia genica è attualmente indicata per i talassemici privi di donatore compatibile, ma nel caso in cui si rivelasse una pratica terapeutica sicura ed efficace sarebbe richiesta dalla totalità dei pazienti arrivando perciò a soppiantare interamente la più rischiosa pratica del trapianto di midollo osseo. L'opzione della terapia genica sarebbe senz'altro preferibile al trapianto qualora si riuscisse a ottenere un'efficiente e duratura correzione del difetto genetico senza il ricorso alla mieloablazione preliminare, condizione che è già stata almeno parzialmente raggiunta nella terapia genica animale, mentre è al momento imprescindibile nel trapianto di midollo osseo. La terapia genica della  $\beta$ -talassemia è stata un obiettivo della ricerca biomedica da alcuni decenni, cioè fin dal momento in cui con pratiche di biologia molecolare si è riusciti a clonare i geni globinici e a sviluppare tecniche di trasferimento e d'integrazione dei geni nel corredo cromosomico cellulare. Infatti, la beta-talassemia soddisfa gran parte dei criteri richiesti ad una malattia candidata alla terapia genica. Essa è una malattia cronica severa che nonostante i progressi medici è ancora gravata

da una elevata mortalità per complicanze intercorrenti (infezioni, insufficienza cardiaca e di altri organi soggetti a sovraccarico marziale).

Infine nella talassemia il tessuto difettoso, cioè il midollo osseo, è facilmente accessibile all'espianto, alla manipolazione delle sue cellule staminali ematopoietiche e alla correzione in vitro del difetto genico con trasduzione genica ex-vivo. Il trapianto successivo del midollo geneticamente corretto è una pratica ben consolidata sostanzialmente simile all'autotrapianto di midollo osseo praticato in caso di tumori.

## La terapia genica

Nonostante le ottime premesse per un rapido successo, numerosi ostacoli precedentemente insospettati si sono interposti nel cammino di una possibile terapia genica vanificando finora il raggiungimento dell'obiettivo. Perché la terapia genica sia efficace e risolutiva è necessario approfondire le conoscenze bio-molecolari e acquisire strumenti e tecnologie che consentano sia di introdurre i geni desiderati sia di garantirne un'espressione stabile e a livelli terapeutici. La principale difficoltà nella terapia genica della  $\beta$ -talassemia è da attribuirsi soprattutto alla peculiare e complessa regolazione dei geni globinici. La comprensione dei meccanismi di regolazione ha richiesto e continua a richiedere uno sforzo notevole per l'identificazione delle sequenze geniche regolatrici in *cis* e in *trans* ai geni globinici. Infatti, sin dai primi esperimenti si è stabilito che il gene globinico, integrato a caso nei cromosomi, solo raramente era espresso in maniera significativa e, quando lo era, l'espressione era generalmente transitoria. Negli ultimi 15 anni sono stati fatti notevoli progressi nell'individuazione delle sequenze e dei geni regolatori implicati nell'espressione dei geni  $\beta$ -globinici. Questi studi preliminari consentono ora l'assemblaggio di vettori di terapia genica molto più stabili ed efficienti in un'unica cassetta d'espressione.

È ormai dimostrato che per ottenere un'espressione ematopoietico-specifica elevata e persistente nel tempo le sequenze regolatrici dei geni globinici presenti nel locus naturale devono essere per quanto possibile ricostituite nei vettori di terapia genica. Le sequenze responsabili della corretta espressione sono contenute nella regione di controllo della locus control region, (LCR) le cui dimensioni sono di circa 20 Kb e quindi troppo grandi perché possa essere inserita in-toto nei vettori comunemente usati per la terapia genica. La maggioranza dei ricercatori ha concentrato perciò gli

sforzi sull'obiettivo di ridurre al massimo le dimensioni degli elementi della LCR mantenendo nel contempo intatte quanto più possibile le proprietà regolatorie. Questo compito si è rivelato quasi insormontabile fintanto che si sono impiegati vettori retrovirali murini. Infatti, gli elementi della LCR che conferiscono le indispensabili proprietà regolatorie sono anche causa di estrema instabilità del vettore retrovirale determinando sia un ridotto titolo di particelle infettanti che la frammentazione della cassetta d'espressione del transgene integrato nel cromosoma. Recentemente i *vettori lentivirali* si sono imposti quali valide alternative ai vettori retrovirali tradizionali. Benché appartenenti alla stessa famiglia dei retrovirus e benché patogeni per gli esseri umani, i vettori lentivirali possiedono delle caratteristiche peculiari che li rendono molto attraenti per l'impiego clinico. Tra queste proprietà segnaliamo la maggiore capacità che consente loro di accogliere sequenze fino a 10 Kb di DNA. Ma la più importante proprietà dei lentivirus è la capacità di infettare cellule quiescenti. Questa seconda proprietà dei lentivirus basati sull'HIV dipende dall'uso di uno specifico processo di translocazione nucleare che consente la penetrazione attiva del virus nel nucleo. I retrovirus murini invece penetrano nel nucleo passivamente all'atto della dissoluzione della membrana nucleare in corso di mitosi e sono perciò meno efficienti nell'infettare le cellule quiescenti. Infine la terza utile proprietà dei lentivirus è attribuita all'azione della proteina *rev* che, legandosi all'RNA virale e proteggendolo dall'azione degli enzimi di splicing, favorisce l'esportazione e l'importazione transnucleare di trascritti lentivirali transgenici intatti perché non sottoposti a splicing, evitando in tal modo la causa maggiore di instabilità del transgene.

## **Vettori lentivirali: classificazione**

I vettori possono essere virali o non virali, e vengono scelti a seconda della natura delle cellule da correggere. I vettori virali sono da preferirsi ove sia necessaria un'alta efficienza di trasduzione in quanto sono naturalmente progettati per trasportare materiale genetico all'interno delle cellule.

Quindi una volta resi inoffensivi per l'uomo, si presentano come veicoli ideali per il trasporto di DNA esogeno.

I vettori virali si dividono in vettori: retrovirali, adenovirali, vettori derivati da herpes simplex virus, vettori adenoassociati. La famiglia dei retrovirus a sua volta viene suddivisa in tre sottofamiglie:

- Oncovirus
- Spumavirus
- Lentivirus

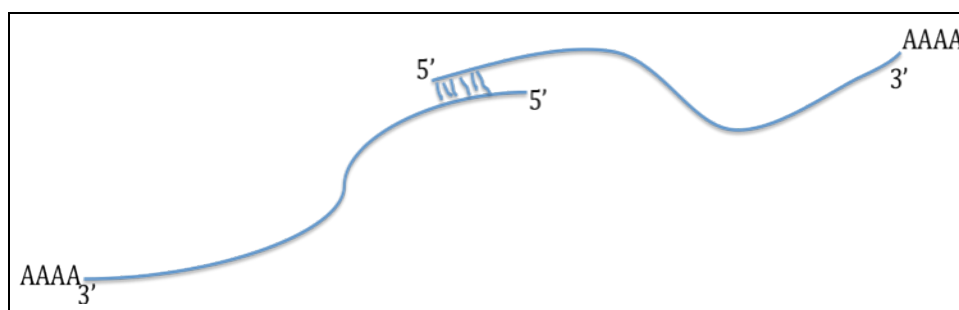
## Lentivirus: morfologia e ciclo replicativo

Lentivirus, come gli altri retrovirus sono in grado di integrare il loro genoma in quello dell'ospite, ma hanno la peculiare caratteristica di poter infettare sia cellule in fase mitotica sia cellule quiescenti [Bukrinsky 1993].

I vettori lentivirali sono sviluppati soprattutto dal virus dell'immuno-deficienza Umana di tipo 1 (HIV-1), virus dell'immuno-deficienza della scimmia (SIV), e virus dell'immuno-deficienza felina (FIV).

I retrovirus sono virus ad RNA che si replicano con un'intermedio a DNA, il quale si integra nel genoma della cellula ospite.

Sono anche l'unico esempio di genoma virale diploide, ha cioè due filamenti di RNA a polarità positiva tenuti insieme a livello delle rispettive estremità 5' tramite legami idrogeno (Figura 4).



**Figura 4** – Filamenti di RNA virale.

I virioni lentivirali sono costituiti da particelle sferiche delle dimensioni di circa 100-120 nm in cui si distingue una regione esterna detta envelope ed una zona centrale contenente il genoma(core).

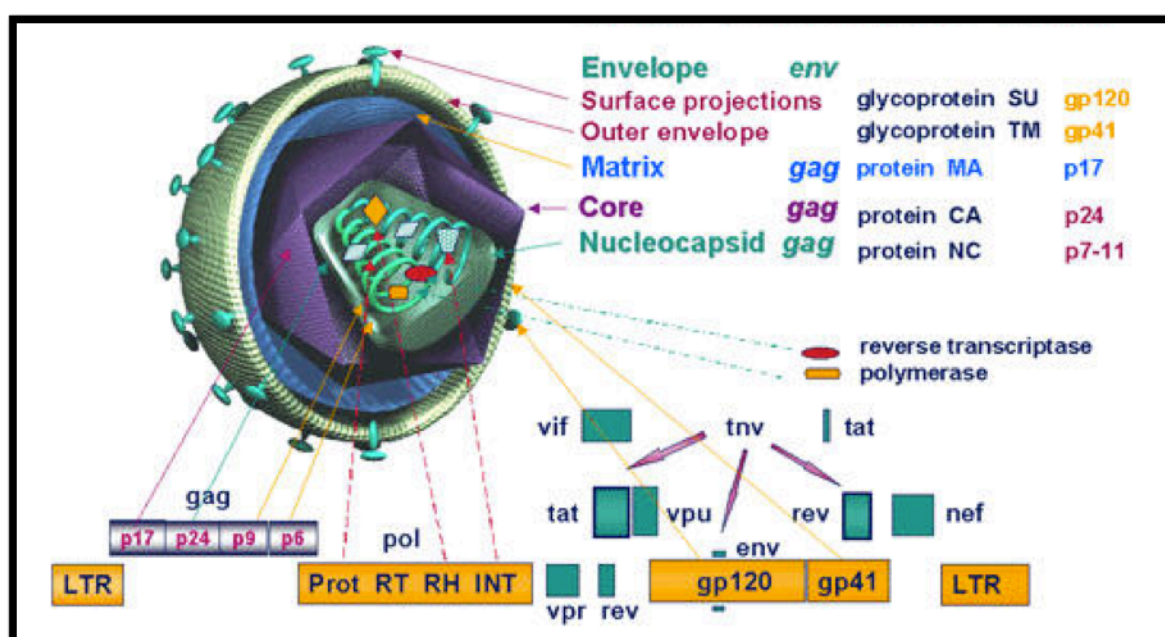
L'envelope è costituito da un doppio strato fosfolipidico di derivazione cellulare da cui protrudono glicoproteine virus specifiche.



L'envelope avvolge il capsid, una struttura rigida costituita da tre o quattro proteine dentro la quale è contenuto il genoma virale che oltre alle due molecole di RNA contiene anche molecole di trascrittasi inversa, proteasi integrasi ed altre proteine.

Il genoma di tutti i retrovirus è costituito di RNA a singolo filamento con polarità positiva che presentano sia un “cap” metilato in 5' che una coda di poli-A in 3' questo rende l'RNA virionico capace di fungere direttamente da RNA messaggero. Ai due estremi la molecola di RNA possiede due sequenze di basi ripetute (R) e due sequenze uniche (U) sia nell'estremo 5' (U5) sia in quello 3' (U3). Da queste due sequenze avranno origine, dopo retro trascrizione, le LTR (Long Terminal Repeat) costituite dalla sequenza U3-R-U5 presente ad entrambe le estremità del genoma. In 5' la LTR, grazie alla presenza di un TATAbox, avrà la funzione di promotore, mentre in 3' servirà per terminare la trascrizione.

All'interno del genoma sono riconoscibili diverse cornici di lettura, *ORF* (*Open Reading Frame*), tra cui le più importanti sono *Gag*, *Pol*, *Env*, che codificano per le principali proteine strutturali e funzionali del virione (Figura 5).



**Figura 5** – Rappresentazione schematica della particella virale e del genoma di HIV-1

Il gene ***gag*** (Group Antigen) codifica per la poliproteina che dopo il processamento darà origine alle proteine strutturali della matrice (MA) del capsido (CA) e del nucleo-capsido (NC).

Il gene ***pol*** invece sintetizza proteine necessarie per la replicazione del virus ovvero la polimerasi (Trascrittasi-inversa), le proteasi che intervengono nella produzione delle proteine funzionali scindendo le poliproteine inizialmente codificate, ed una endonucleasi/integrasi che serve all'inserimento del provirus nel genoma della cellula ospite.

Il gene ***env*** codifica per le proteine virus specifiche che saranno poi esposte sulle envelope.

Oltre a queste tre grandi ORF sono presenti altre cornici di lettura più piccole che esprimono proteine regolatorie quali i geni ***tat***, ***rev***, ***nef***, ***vif***, ***vpr***, ***vpu***.

Il gene ***tat*** esprime una proteina che ha forte attività trans attivante sull'espressione genica. Mentre il gene ***rev*** codifica per una proteina che riconoscendo e legando una sequenza specifica sul gene *env* chiamata ***RRE*** (*Rev Responsive Element*) presente su tutti gli mRNA unspliced, dirige lo spostamento dei trascritti virali facilitandone il passaggio attraverso la membrana nucleare [Henderson 1997].

In breve il ciclo replicativo dei lentivirus inizia con l'ancoraggio del virione alle cellule sensibili attraverso le glicoproteine di membrana codificate dal gene *env*.

In seguito a tale legame si ha la fusione tra la membrana della cellula ospite e quella virale e subito dopo l'eliminazione degli involucri proteici ha inizio la retro-trascrizione dell'RNA virale in una molecola di DNA (a doppio filamento) ad opera della trascrittasi-inversa che da prima sintetizza una molecola di DNA a partire da RNA creando un'ibrido DNA-RNA e poi grazie alla sua attività RNasica demolisce il filamento di RNA e lo sostituisce con un altro DNA complementare che viene

trasportato attivamente nel nucleo dove grazie all'azione dell'integrasi virale, che taglia il DNA cellulare, e si inserisce nel genoma della cellula ospite.

Il DNA virale integrato (*provirus*) viene quindi trascritto utilizzando la RNA polimerasi II della cellula. Verranno prodotti diversi tipi di RNA ovvero mRNA per la produzione delle proteine virali ed RNA che andrà a costituire il genoma della nuova progenie virale.

Quando tutti i componenti virali sono presenti in quantità necessarie, avviene *l'incapsidamento*, ovvero l'assemblaggio del nucleocapside. Grazie alla sequenza  $\psi$  o "segnale di incapsidamento", localizzata tra l'UTR ed il gene GAG, le due copie di RNA virale e i quattro enzimi vengono inseriti nel capsido [Browning 2003]. Infine i nucleocapsidi si spostano verso la membrana cellulare da dove fuoriescono per gemmazione acquisendo così l'envelope.

## **Lentivirus come vettori**

Numerosi sono i metodi sviluppati per l'inserimento del DNA nelle cellule: elettroporazione, microiniezione, gene *gun*, liposomi ecc, metodi che pur riuscendo nel loro scopo non hanno mostrato di avere l'efficienza e la specificità necessaria a renderli utili nella terapia genica.

Poiché i virus hanno la capacità naturale di inserire il loro genoma nelle cellule bersaglio sono risultati gli strumenti ideali per il trasferimento genico e quindi per la terapia genica.

Per questo motivo sono stati sviluppati vettori basati su numerosi tipi di virus quali: Adenovirus, Herpes simplex virus, Virus adenoassociati e retrovirus [Kay 2001]. Data la capacità di integrarsi stabilmente nel genoma cellulare e di riuscire a veicolare fino a 10Kb di DNA eterologo, gli studi si sono focalizzati sulla famiglia dei retrovirus ed in special modo sui lentivirus che, tra i retrovirus, sono gli unici ad aver mostrato la capacità di infettare anche cellule quiescenti.

Questa loro abilità è dovuta al fatto che hanno sviluppato un meccanismo di trasporto attivo del loro genoma all'interno del nucleo cellulare riuscendo quindi a infettare le cellule senza attendere che la membrana nucleare si dissolva in seguito al processo mitotico.

Il virus dell'HIV1 è uno tra i primi ad essere stato usato come vettore lentivirale [Naldini 1996]. Ovviamente l'utilizzo di un virus patogeno quale l'HIV1 rende necessario lo sviluppo di strategie che riescano a renderlo non in grado di infettare. Per questo motivo nella costruzione di questo tipo di vettori si cerca di suddividere più possibile il genoma virale ed eliminare le proteine non necessarie. Questi accorgimenti sono indispensabili per evitare più possibile la produzione di

***Retrovirus Replicazione Competenti*** (RCR) a seguito di eventi di ricombinazione [Kay 2001].

Con il tempo i costrutti si sono evoluti per assicurare sempre maggior sicurezza. I vettori virali di prima generazione erano composti da tre costrutti: un costrutto di ***packaging***, uno di ***envelope*** ed uno ***target***. Nel costrutto di packaging erano presenti tutte le sequenze virali tranne *env*. In tutti e tre i costrutti la 5'LCR è stata sostituita con un promotore eterologo e la 3'LCR con un segnale di polia-adenilazione [Parolin1994]. Infine il segnale di incapsidamento ( $\psi$ ) è stato deletato per impedire che questi geni vengano incapsidati nei virioni ricombinanti.

Il costrutto envelope codifica per proteine dell'envelope virali, mentre nel costrutto ***target***, oltre al gene che vogliamo veicolare, sono presenti le LCR in 5' ed in 3', il segnale di incapsidamento  $\psi$  e la sequenza *RRE*.

Per rendere i costrutti sempre più sicuri nei vettori di seconda generazione si è cercato di eliminare dal packaging più proteine-accessorie possibile.

La terza generazione di vettori lentivirali è chiamata *Self-inactivating* (SIN) in quanto, in seguito alla delezione dell'U3 in 3', hanno la caratteristica di perdere le informazioni necessarie per altri cicli di replicazione dopo la retro trascrizione [Zufferey 1998]. Inoltre i costrutti necessari alla produzione dei virioni diventano quattro, infatti il gene *rev* è stato separato dal costrutto di packaging per essere inserito in un altro plasmide. Inoltre il costrutto ***target*** viene fornito di un promotore forte come quello del Citomegalo virus (CMV) o del Virus del Sarcoma di Rous [Dull 1998] che rende superfluo il gene *tat* che viene a sua volta deletato.

Tutti questi accorgimenti rendono i vettori lentivirali molto efficaci e sempre più sicuri sia dal punto di vista dell'operatore che da quello terapeutico.

Per garantire il maggior tropismo possibile dei virioni ricombinanti e renderli quindi in grado di trasdurre un numero elevato di tipi cellulari, si ricorre alla *pseudo-tipizzazione* [Srinivasakumar 2001] che determina l'inserimento di glicoproteine derivate da altri virus, quali ad esempio il Virus della Vescicola Stomatite, sull'envelope dei virioni ricombinanti.

## **Terapia genica della $\beta$ -talassemia tramite vettori lentivirali**

Nell'anno 2000 per la prima volta nella storia della medicina si è ottenuta la guarigione di una malattia genetica umana con l'uso della terapia genica [Cavazzana-Calvo]. In questo caso la malattia genetica guarita era una immunodeficienza grave combinata (X-SCID) che in assenza di terapia genica o di trapianto di midollo osseo allogenico è generalmente letale. Poco dopo anche un gruppo italiano ha trattato con successo e con un protocollo molto simile un'altra SCID dovuta a un difetto nell'enzima adenosina deaminasi (Aiuti, Vai 2002) (Aiuti, Slavin 2002). Questi successi hanno suscitato entusiasmo per la possibile imminente estensione del protocollo terapeutico alla talassemia, tuttavia bisogna ricordare che la talassemia è una malattia più difficile da curare in quanto causata da un difetto genico strutturale anziché enzimatico e necessita perciò valori d'espressione del transgene molto più elevati. Inoltre nella terapia genica del difetto X-SCID un vantaggio selettivo ha consentito alle cellule trasdotte di ovviare ad una ridotta efficienza di trasduzione cellulare, situazione che non dovrebbe verificarsi nella stessa misura nel caso della  $\beta$ -talassemia. Tuttavia, per quanto i vettori lentivirali siano ancora soggetti a severe restrizioni d'uso in relazione alla possibile pericolosità sull'uomo, è stata approvata una sperimentazione clinica basata sul loro impiego per le emoglobinopatie- $\beta$  nell'Università di Strasburgo in Francia. Inoltre i significativi risultati di questi ultimi anni, rendono ottimisti sulla possibilità di poter estendere l'impiego della terapia genica anche ai malati di  $\beta$ -talassemia e questo sarà possibile qualora si riuscisse a disporre di vettori con una migliore regolazione della cassetta d'espressione globinica e maggiori sicurezze nell'impiego clinico. In alcuni lavori recenti, condotti principalmente dal gruppo del prof. Sadelain, il gene  $\beta$ -globinico trasdotto con

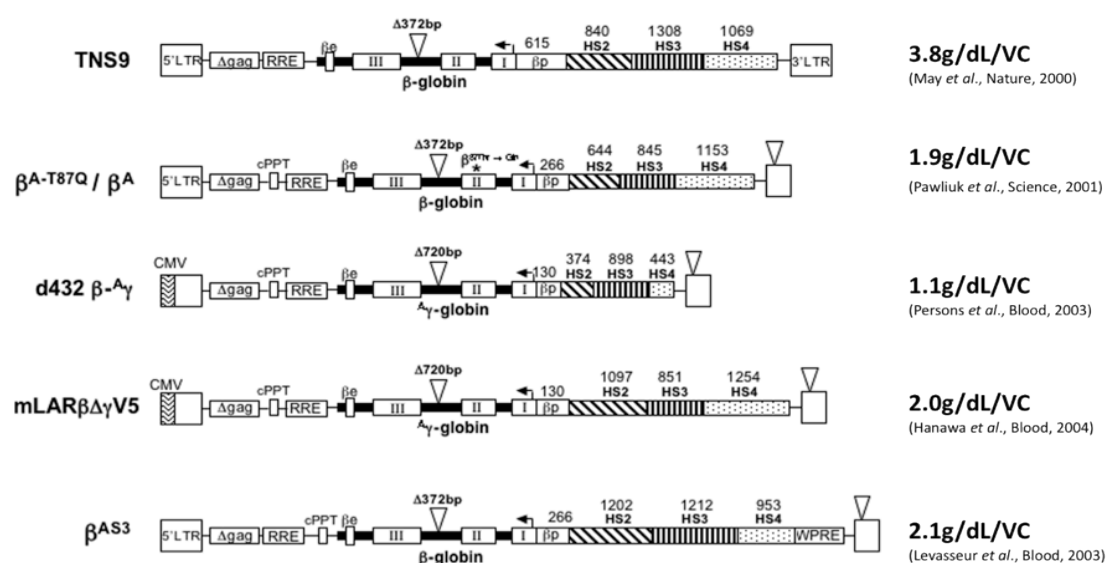
vettori lentivirali mostra un'espressione significativa, persistente ed eritroide-specifica sia in linee cellulari stabili che in modelli murini transgenici [Sadelain 2002, Rivella 2003].



## SCOPO DELLA TESI

Il fine del progetto è quello di sviluppare nuove cassette d'espressione e vettori di trasduzione da saggiare in modelli animali, introducendo diverse modifiche rispetto ai costrutti impiegati in precedenti lavori ed in special modo rispetto al vettore lentivirale  $\beta$ -globinico sviluppato da Sadelain e colleghi [Sadelain 2002], TNS9, che si è mostrato efficace nel trattamento di modelli murini di talassemia intermedia e major [May 2000 Rivella 2003]. Le modifiche che intendiamo apportare nel vettore di riferimento TNS9 sono volte a ottenere miglioramenti nel titolo virale e nei livelli di espressione. Infatti, in tutti i vettori  $\beta$ -globinici finora sviluppati i livelli di espressione sono appena la metà di quelli dei geni globinici umani. (Figura 6). Inoltre dato che l'inserimento random dei vettori nel genoma cellulare possono causare mutazioni inserzionali [Williams 2003] è auspicabile ottenere alti livelli di espressione con l'integrazione di una sola copia di vettore per cellula.

Le modifiche che intendiamo apportare nella cassetta  $\beta$ -globinica del vettore lentivirale riguardano le sequenze del gene  $\beta$ -globinico e degli elementi regolatori



**Figura 6** – Rappresentazione schematica di alcuni vettori  $\beta$ -globinici e loro espressione

Innanzitutto intendiamo operare alcune modifiche dell'IVS2 reintroducendo sequenze precedentemente delete in quanto ritenute destabilizzanti in tutti i precedenti esperimenti di trasduzione con i gamma-retrovirus. Tutti i vettori retrovirali e lentivirali globinici attualmente in circolazione contengono una delezione dell'introne 2 che rimuove un frammento RsaI di circa 400 pb. Questa delezione si è resa necessaria in quanto il frammento contiene numerosi siti di poliadenilazione che durante la retro-trascrizione dell'RNA virale causano interruzione prematura del trascritto e l'integrazione nel genoma di vettori tronchi generalmente inefficaci. Nel passaggio dai vettori gamma-retrovirali ai nuovi vettori lentivirali basati sullo scheletro del virus dell'HIV si è ritenuto di non modificare la regione intronica in quanto si ipotizzava che l'instabilità intronica si manifestasse anche nei lentivirus. Tuttavia i lentivirus hanno un sistema di esporto dell'RNA virale mediato dal gene REV che garantisce l'esportazione nucleare dell'intero trascritto senza subire splicing. E' perciò possibile che l'instabilità del vettore indotta dal frammento RsaI dell'IVS2 non si presenti nel caso dei lentivirus. Recuperare il frammento deletato può essere importante in quanto esso contiene non soltanto elementi destabilizzanti ma anche elementi enhancer che legano fattori di trascrizione attivanti quali il fattore Oct1 e il fattore eritroide specifico GATA1. In particolare il sito di legame per il fattore Oct1 è stato dimostrato in esperimenti su topi transgenici essere effettivamente un enhancer che determina un'incremento dell'espressione del gene globinico di circa il 33% [Rikki 2003]. Altri ricercatori [Ostermeier 2003], hanno riportato la presenza in questa stessa regione di siti MARs (Matrix Attachment Region) Secondo alcuni studi le regioni MARs sono siti di legame per proteine, quali SATB1, [Zheng 2012] che acetilando gli istoni consentono di antagonizzare l'invasione dell'eterocromatina mantenendone

l'espressione anche in sedi in cui la cromatina ha normalmente configurazione "chiusa" e perciò non permissiva ai fini dell'espressione genica [Luis 2001, Forrester 1999].

Uno degli scopi della tesi è stato quello di verificare se la reintroduzione di porzioni o dell'intera IVS2 migliora l'espressione dei geni globinici senza interferire negativamente con la stabilità del vettore e quindi anche con il titolo del virus.

Per mantenere l'IVS2 ed evitare l'instabilità del vettore abbiamo deciso di introdurre diverse mutazioni puntiformi che vanno a inattivare i siti di poliadenilazione e valutare l'efficacia di queste modifiche nel miglioramento del titolo virale.

Il promotore che comanda l'espressione della cassetta sarà in entrambi i costrutti derivato sempre dal promotore del gene  $\beta$ -globinico. Di recente sono stati proposti promotori eritroidi alternativi al promotore  $\beta$ -globinico, ovviando così al problema dell'instabilità intrinseca in questo promotore. Visti i risultati positivi ottenuti da Leboulch con un promotore di appena 200bp, pensiamo di usare la stessa sequenza del promotore  $\beta$ -globinico [Pawliuk 2001].

Per completare la cassetta di espressione in modo da assicurare alti livelli di espressione, alcune sequenze regolatrici della LCR devono necessariamente far parte del costrutto transgenico. Le sequenze regolatrici della LCR che abbiamo impiegato sono le stesse utilizzate da Sadelain nel vettore di riferimento TSN9 e cioè HS2, HS3 e HS4 nelle varianti estese che hanno dimostrato la maggiore efficacia fra tutti i vettori in circolazione. Tuttavia in alcuni vettori noi abbiamo introdotto anche il sito ipersensitivo 1 (HS1), sito che nella costruzione dei vettori viene spesso omissso in base all'osservazione che una delezione umana di questo sito è influente sull'espressione globinica. Alcuni studi tra i quali quelli di Grosveld nei topi transgenici dimostrano invece che l'LCR globinica lavora come un "olocomplesso"

[Ellis 1996] e che quindi anche il sito HS1 può essere utile dell'espressione dei costrutti virali sintetici. In altri costrutti abbiamo impiegato una microLCR costituita dagli elementi assemblati da Enver [Enver 1989] modificata da noi per l'aggiunta nel sito HS4 di altre 700bp all'estremità 5' ritenute importanti per l'espressione in lavori sui topi transgenici.

Ancora per cercare di migliorare l'espressione della cassetta globinica abbiamo voluto provare ad inserire la sequenza dell' ERV9, un elemento retrovirale endogeno descritto da Long [Long 1998] situato in posizione 5' rispetto all'HS5. Il promoter di ERV9 è costituito dalla ripetizione di una breve sequenza di 40bp che contengono siti di legame per fattori eritroidi come GATA1 e CAAT *binding proteins*, questo ci induce a pensare che possa avere effetti positivi sull'espressione della cassetta globinica lentivirale.

## Materiali

### Linee cellulari

Il presente lavoro è stato condotto utilizzando le seguenti linee cellulari:

MEL: cellule di eritro-leucemia murina. (ATCC CRL-2302) coltivate in terreni Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) addizionato con L-Glutammina (2.5 mM), 10% (v/v) di Siero Fetale Bovino (FBS) e 1% (v/v) di penicillina (100U/ml) e streptomicina (100 µg/ml).

293T: linea cellulare derivata da cellule embrionali di rene umano a morfologia stellata coltivate in DMEM addizionato con 10% (v/v) di FBS inattivato e 1% (v/v) di penicillina (100 U/ml) e streptomicina (100 µg/ml). Questa linea cellulare contengono stabilmente integrato nel genoma la sequenza genica codificante l'antigene T del Virus Vacuolante della Scimmia (SV40), necessaria per un'efficiente replicazione dei vettori plasmidici recanti l'origine di replicazione di SV40.

Tutte le colture cellulari sono state mantenute alla temperatura costante di 37°C in un incubatore (Hereaus HERA CELL150) ad atmosfera umidificata al 5% (v/v) di CO<sub>2</sub>.

## Metodi

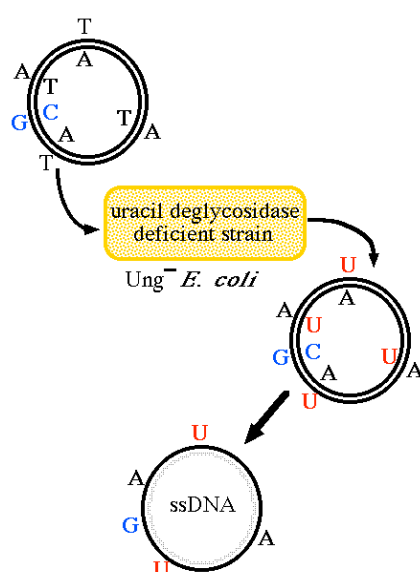
Il lavoro sperimentale su cui è basata questa tesi consiste nell'impiego di un vettore lentivirale basato sull'HIV-1 al fine di veicolare il gene della  $\beta$ -globina.

È stato impiegato un sistema lentivirale di seconda generazione costituito da tre costrutti: plasmide *packaging* pCMV- $\Delta$ R8.9 basato su HIV-1, caratterizzato da un promotore CMV derivato dal Citomegalovirus. Sono presenti inoltre il segnale di packaging  $\psi$ , le sequenze PBS (Primer Binding Site) e cPPT (central Poly-Purine Tract), essenziali per la retrotrascrizione del vettore, la sequenza RRE, per l'esporto dei trascritti dal nucleo, la sequenza WPRE, che conferisce stabilità al trascritto virale. Il costrutto *envelope* è il pMDG-VsVg pseudotipizzato per la Vescicola Stomatite. Ed infine il costrutto *target* è rappresentato dal TNS9 e dai vari costrutti da noi preparati.

### Mutagenesi sito-specifica di Kunkel

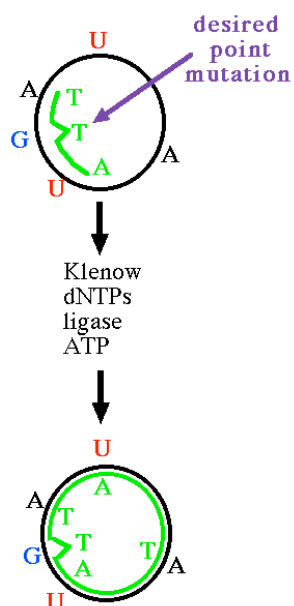
Innanzitutto abbiamo clonato la nostra cassetta  $\beta$ -globinica da mutagenizzare nel fagemide pbs sk+. I fagemidi sono vettori plasmidici che contengono l'origine di replicazione batterica e l'origine di replicazione fagica a monte del gene III (gene che esprime una proteina capsidica del fago M13) con un MCS (sito di multiclonaggio) a valle dove inserire il gene di interesse. Questo fagemide per moltiplicarsi ha perciò necessità di un fago helper che contenga le sequenze di packaging del fago, in modo tale che si formino particelle fagiche con DNA a singolo filamento. Abbiamo perciò trasformato il pbs-sk+ con un ceppo di E.coli dut<sup>-</sup> ed ung<sup>-</sup>. In questo caso ho utilizzato E.coli CJ236 un particolare tipo di cellule mutagenizzate in modo tale da essere prive dell'enzima dUTPasi (Dut). Questo determina porta la cellula ad immagazzinare grandi quantità di dUTP che competono con la dTTP per

l'incorporazione nel DNA. Inoltre, poiché le CJ236 non possiedono nemmeno l'enzima uracil-N-glycosilasi (Ung<sup>-</sup>) l'uracile non può essere rimosso dal Dna. La coltura batterica viene poi infettata con il fago T-Helper R408 che “aiuta” la replicazione del fagemide contenente la cassetta b-globinica. Si avrà quindi la produzione di progenie virale a singolo filamento di DNA in cui le timine sono state sostituite dall'uracile (Figura 7)



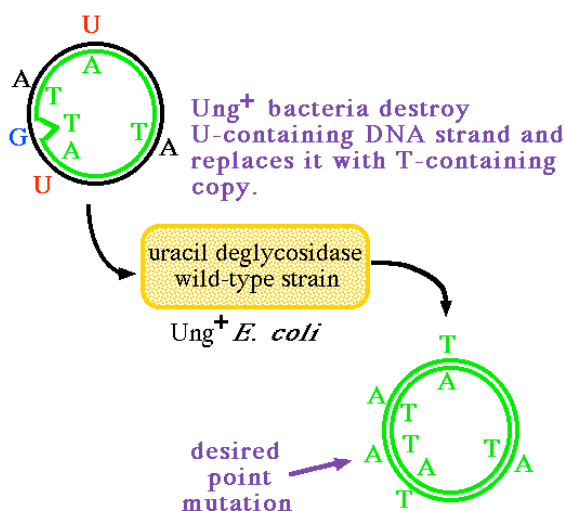
**Figura 7**

Questo filamento di DNA viene utilizzato come stampo per una mutagenesi standard dove oligonucleotidi contenenti la mutazione desiderata, fungono da primers e vengono fatti ibridare con il plasmide per generare una molecola heteroduplex con l'uracile nello *strand* stampo e la timina nello strand mutagenizzato (Figura 8).



**Figura 8**

infine questo ibrido è stato utilizzato per trasformare un ceppo di *E. coli*  $\text{dut}^+$  ed  $\text{ung}^+$ , in questo caso XL1blue, che distruggono il vecchio filamento stampo contenente Uracili e utilizzano il filamento contenente le mutazioni, da noi introdotte, per la produzione del plasmide (Figura 9)



**Figura 9**

A questo punto le cassette globiniche derivate dalla mutagenesi in diversi punti del gene  $\beta$ -globinico e/o della LCR sono state tagliate dal pbsSK+ e utilizzate per la costruzione dei diversi vettori.



## Costrutti plasmidici

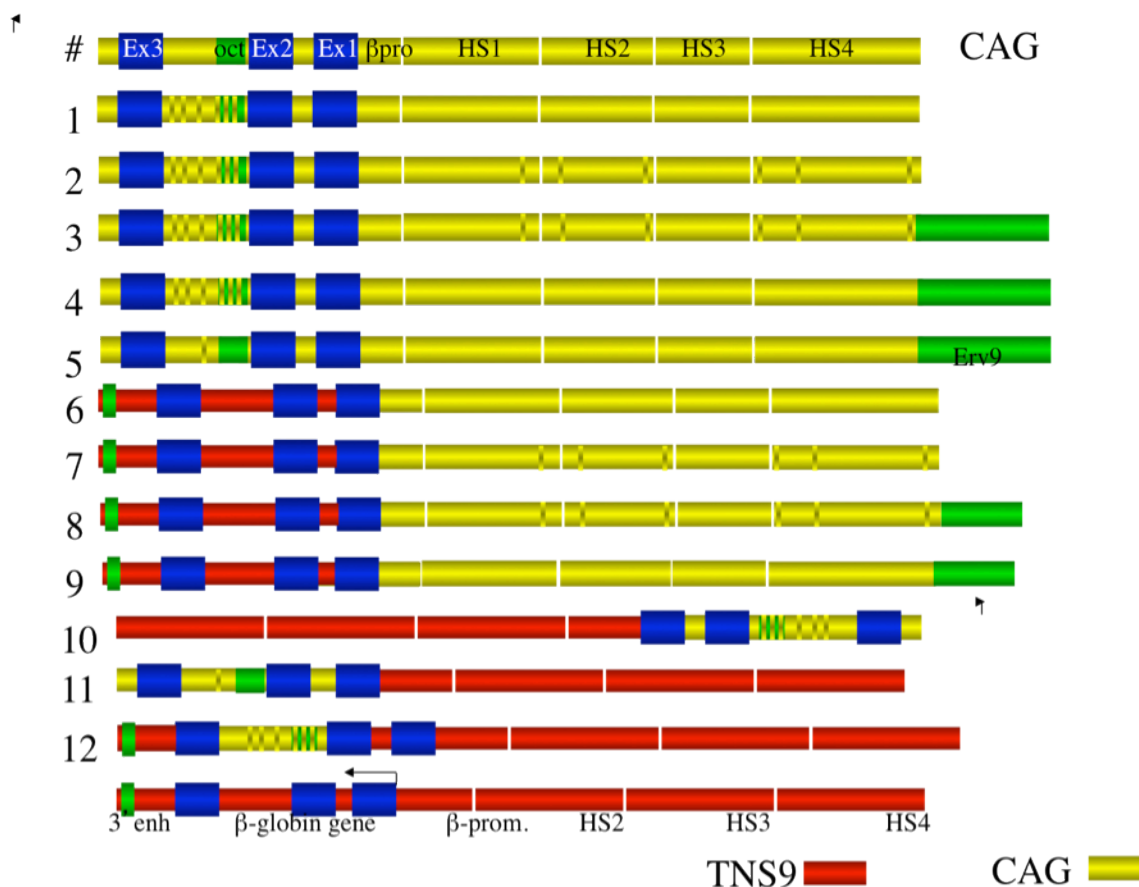


**Figura 10 – Struttura del vettore TNS9**

Il vettore lentivirale di partenza è il TNS9 dove il gene beta-globinico (dalla posizione -615 alla +2484 compreso l'enhancer in 3') era sub-clonato nel plasmide pHR'LacZ, andando a rimpiazzare la sequenza CMV-LacZ. Questo vettore contiene 3,3Kb della Locus Control Region nello specifico: 840bp dell'HS2 (SnaBI-BstXI), 1308bp dell'HS3 (HindIII-BamHI) e un frammento di 1069bp dell'HS4 (BamHI-BanII)

Il gene  $\beta$ -globinico è regolato da un promotore di 615 paia di basi ed è modificato nell'introne 2 per l'introduzione di una delezione atta a rimuovere elementi destabilizzanti. Sia il gene  $\beta$ -globinico che lo scheletro del vettore lentivirale hanno una serie di modifiche atte a ridurre la possibilità di splicing alternativi e di siti di poliadenilazione criptici. La cassetta d'espressione globinica nel vettore TNS9 è inserita come prescritto in direzione antisenso rispetto alla trascrizione del promotore lentivirale (5'-LTR) per minimizzare la possibilità di splicing in corrispondenza dei siti accettori e donatori adiacenti agli introni naturali.

### Costrutti plasmidici mutati.



**Figura 11** - Costrutti plasmidici sviluppati nel nostro laboratorio. In basso il costrutto TNS9 utilizzato per alcuni clonaggi.

I costrutti plasmidici sono stati preparati utilizzando varie combinazioni tra il vettore TNS9 e una micro LCR che possedesse tutti e 4 i siti ipersensitivi.

Il costrutto di partenza (CAG, in giallo nella figura 11) utilizzato come base per la progettazione dei vari plasmidi comprende una microLCR ( $\mu$ LCR),  $\beta$ -promoter di circa 250bp, esoni 1 2 e 3, ed un'ampia porzione di IVS2, mutagenizzata nei siti di poliadenilazione, che comprende il sito di legame per l'octamero.

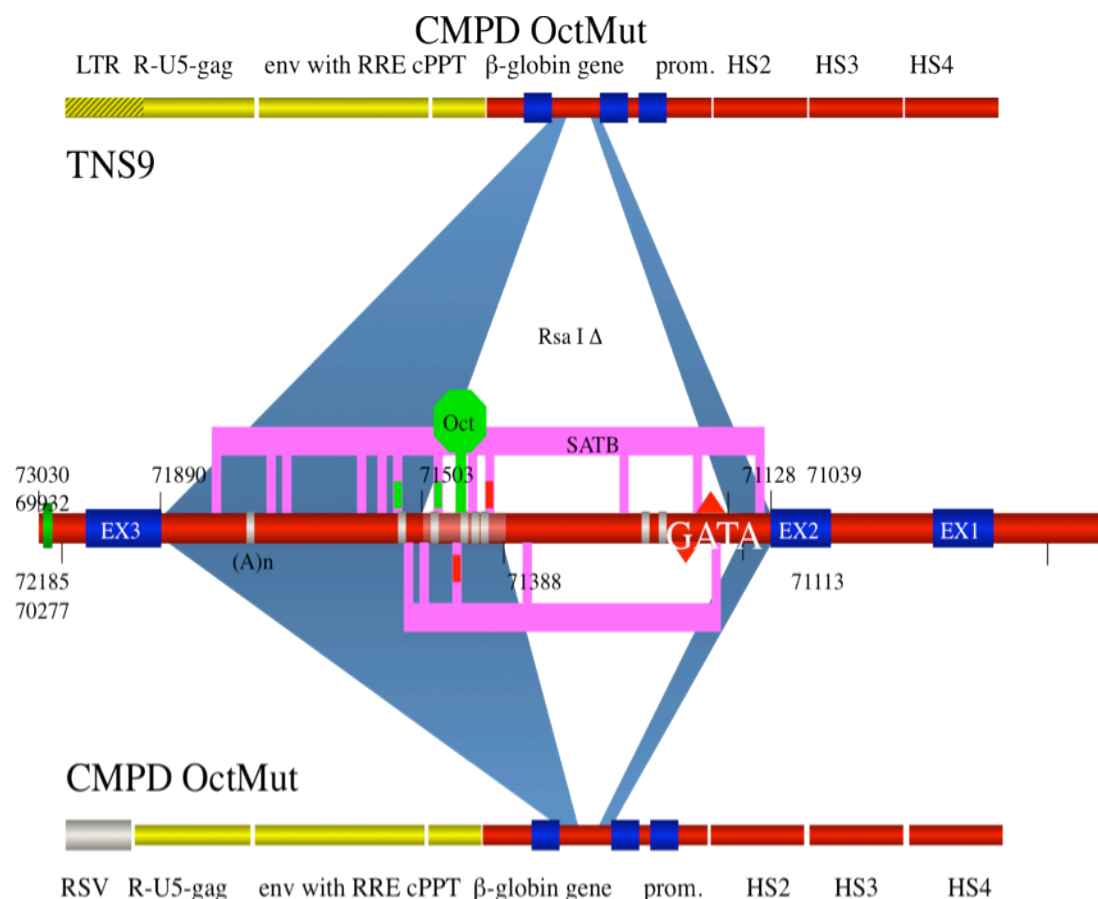
Le cassette n°1 e 2 sono quasi identiche eccetto che per la presenza di mutazioni a livello dell'HS1-HS2-HS4 nel costrutto 2 e ha lo scopo di valutare l'importanza dei siti di poliadenilazione criptici ivi presenti ai fini della stabilità del vettore.

I costrutti n°3 e n°4 contengono l'ERV 9 (segmento verde) e sono utili per valutare l'importanza di questo elemento ai fini dell'espressione globale del vettore.

I costrutti 6-7-8-9 sono stati costruiti utilizzando il vettore TNS9 tranne che per il  $\beta$ -promoter e la  $\mu$ LCR che invece sono quelle dei vettori CAG.

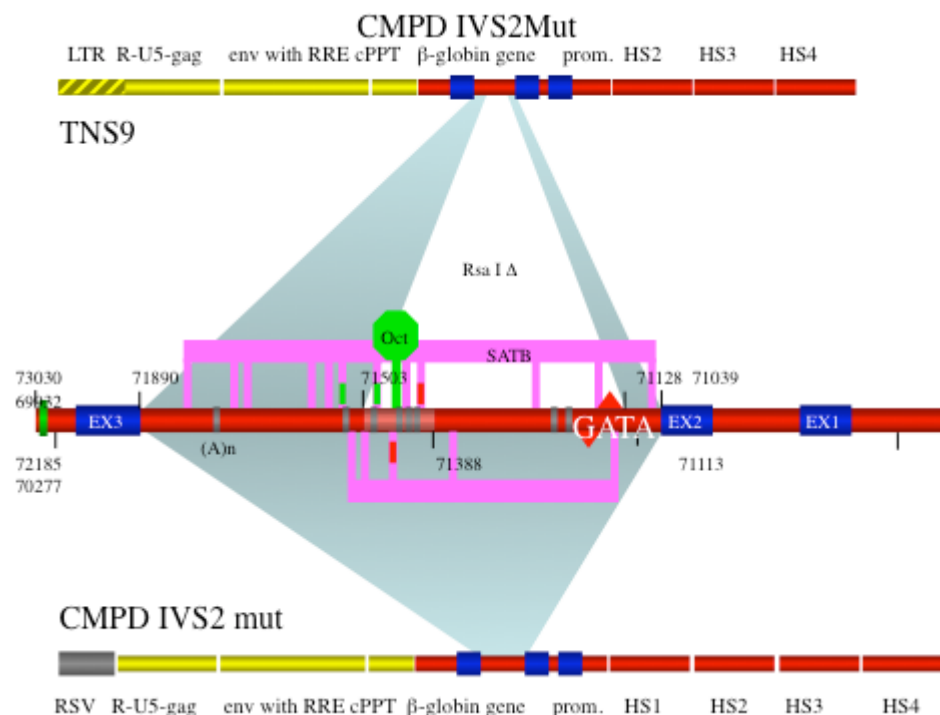
Il costrutto n°10 è orientato in direzione opposta, mentre l'11 ha la uLcr del vettore TNS9 e la porzione IVS2 ampliata di CAG.

Infine il costrutto n°12 che abbiamo denominato CMPDOct verrà di seguito spiegato più nel dettaglio.



**Figura 12** – Schema del vettore CMPDOct. In alto è rappresentato il vettore TNS9 mentre al centro il gene  $\beta$ -globinico.

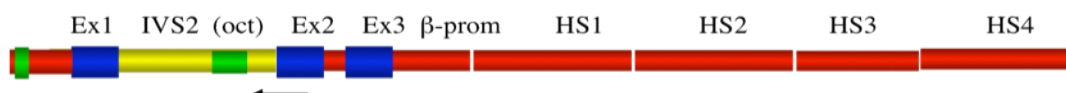
Il costrutto CMPD Oct (n°12), rappresentato in figura 12, è stato ottenuto mantenendo HS2-3 e 4 e sito enhancer del vettore TNS9, da cui si differenzia solo per la presenza di una più ampia porzione di IVS2 contenente il sito di legame per l'octamero ed alcuni siti della proteina SATB1. Inoltre i siti di poli-adenilazione mutagenizzati dell'IVS2 sono stati mutagenizzati.



**Figura 13** – Schema del vettore plasmidico CMPD IVS2 mut raffrontato al vettore TNS9 e al gene  $\beta$ -globinico.

Il costrutto vettore CMPD.IVS2 mut è identico al plasmide CMPDOct tranne che per l'IVS2 che in questo caso è stata inserita senza delezione alcuna in modo tale da ripristinare tutti i siti di legame per la proteina SATB1. I siti di poliadenilazione anche in questo caso sono stati deleti inserendo mutazioni in posizione +225, +243/44, +402/403, +453, +525 e +762 rispetto all'inizio dell'introne.

#### CMPD IVS2 full



**Figura 14** – Rappresentazione schematica della struttura del CMPD IVS2Full.

Un ulteriore costrutto di controllo, CMPD.IVS2 Full (Figura 14) è stato preparato inserendo l'intera IVS2 senza alcuna mutazione, questo per valutare l'importanza delle mutazioni ai fini della stabilità del vettore.

## **Produzione del virus e trasduzione dei costrutti in cellule MEL**

Ottenuti i costrutti, il passo successivo è stato quello di utilizzarli per la produzione di virus.

Gli stocks dei virus sono stati preparati attraverso l'utilizzo di vettori lentivirali di 2° generazione transfettando cellule 293T con il metodo del Calcio-Fosfato. Abbiamo eseguito una tripla transfezione del vettore target, del PCMVDR8.9 e del PMD.G. Le 293T (5x10<sup>6</sup> cells/piastra) sono state seminate 24h prima della transfezione in piastra da coltura cellulare da 100mm di diametro (Falcon) preventivamente trattati con Poly L-lysina (Sigma P) e lasciate crescere in DMEM (Sigma) con 10% di siero fetale bovino, penicillina 100U/mL, streptomicina 100ug/mL, in incubatore a 37°C e al 5% di CO<sub>2</sub>.

Il giorno successivo, 1h prima della transfezione, il terreno di coltura è stato aspirato e sostituito. A questo punto le 293T devono aver raggiunto il 70/80% di confluenza. Per ogni piastra di transfezione sono stati utilizzati complessivamente 20ug di DNA: 3,5ug del plasmide Envelope pMD.G-VsVGg, 6,5ug del plasmide di packaging pCMVΔR8.9 e 10ug del vettore contenente il gene da trasdurre. Tutti i plasmidi sono stati preparati con kit di purificazione dalle endotossine batteriche.

A questa miscela di DNA sono stati aggiunti 50ul di CaCl<sub>2</sub> 2,5M, e H<sub>2</sub>O sino ad un volume di 500μl. Dopo aver agitato bene la soluzione si aggiungono, 500μL di 2X HEPES Buffered saline (HBS) a pH 7,12. Il precipitato così ottenuto si versa direttamente sulle cellule che vanno riposte nuovamente in incubatore per altre 14/16h. Il giorno seguente si procede nuovamente alla sostituzione del medium.

La raccolta del virus è stata eseguita 48h dopo la trasfezione: il surnatante raccolto e centrifugato a bassa velocità, è stato filtrato attraverso filtri di acetato di cellulosa con porosità 0,45um (Millipore filter units) per eliminare cellule e detriti cellulari.

Il virus viene in seguito concentrato attraverso ultracentrifugazione a 25000rpm a +4°C per 2h in centrifuga Beckman. Il surnatante viene poi scartato ed il pellet risospeso over-night in X-Vivo 15 serum free (Gibco BRL) a +4°C

### **Titolo Virale**

Per titolare il virus sono state utilizzate cellule Hela. Il primo giorno le cellule sono state seminate in piastre del diametro di 35mm con una densità di circa  $1 \times 10^5$  cellule per pozzetto.

Il giorno successivo abbiamo contato nuovamente le cellule di un pozzetto per accertarci di avere circa  $2 \times 10^5$  cellule. Dopodiché abbiamo preso 10ul di surnatante virale e l'abbiamo diluito 1:100 in 1ml di DMEM del primo pozzetto. Sono state poi effettuate 4 diluizioni seriali prendendo 100ul di terreno con virus dal primo pozzetto e diluendolo nel secondo contenente 900ul di DMEM, la stessa cosa per il 3°, il 4° ed il 5°. Per favorire la trasduzione si aggiunge il polibrene alla concentrazione finale di 10ug/ml. Il terzo giorno si sostituisce il terreno per eliminare il polibrene giacché è tossico per le cellule.

Tre giorni dopo la trasduzione le cellule vengono staccate e contate mediante microscopio a fluorescenza.

Il titolo è dato dalla formula

$$\%positivi / 100 \times diluizione \times n^{\circ}cells \text{ contate il } 2^{\circ}giorno$$

### **Infezione in cellule Mel**

Il virus così ottenuto è stato utilizzato per trasdurre cellule MEL. Le cellule sono state contate e suddivise in piastre da coltura cellulare da sei pozzetti alla

concentrazione di  $1 \times 10^5$  cellule per pozzetto in un ml di DMEM. Dopodiché abbiamo somministrato 10ul di virus per pozzetto in presenza di Polybrene (4ug/ml, Sigma).

### **Selezione e induzione dei cloni**

Ventiquattro ore dopo la trasduzione abbiamo sostituito il terreno e messo le cellule in selezione aggiungendo Methotrexate ( $5 \times 10^{-7} \text{M}$ ) questo perché il vettore possiede appunto il gene per la resistenza a questo farmaco. Le cellule trasdotte sono state tenute in selezione per un minimo di 14 giorni in modo tale da selezionare solo le cellule che avevano integrato il vettore in modo stabile. Trascorso questo periodo di selezione e amplificazione dei cloni cellulari abbiamo indotto le cellule alla differenziazione aggiungendo HMBA (N,N-hexamethylene bisacetamide) al terreno di coltura in concentrazione finale di 5mM [Reuben1976].

### **Estrazione di DNA, RNA**

Le MEL indotte sono state quindi raccolte ed utilizzate per l'estrazione di DNA ed RNA utilizzando la metodica del "TRIZol". Le cellule vengono centrifugate per 10 min a 1200 rpm, separate dal supernatante e quindi risospese in 1 ml di TRIZol per  $5 \times 10^6$  cellule (Total RNA Isolation Reagent, Celbio, Milano, Italy). I campioni di mRNA ottenuti applicando questa metodica di estrazione, vengono conservati a  $-20^\circ$ . La quantità e l'integrità dell'RNA sono state saggiate tramite elettroforesi su gel di agarosio e lettura allo spettrofotometro..

### **Analisi con RTPCR**

Abbiamo poi effettuato una RT-PCR per ottenere un'analisi quantitativa dell'espressione del gene B-globinico umano. La RT-PCR viene effettuata sul cDNA



(sequenza di DNA codificante) complementare all'RNA citoplasmatico totale estratto dai cloni in cellule Mel trattate con HMBA. Questa sintesi è effettuata mediante una reazione di retro-trascrizione. Come substrato per la produzione di cDNA a singolo filamento abbiamo utilizzato 1 µg di RNA totale citoplasmatico. Terminata la reazione, l'amplificato viene conservato a -80°C.

### **Analisi con TaqMan GAG del numero di copie di vettore**

Per indagare queste variazioni sono stati ideati dei saggi che permettono di quantificare gli mRNAs prodotti dalle cellule in esame e specifici per ciascun gene globinico. Partendo dal cDNA ottenuto dalla retro-trascrizione dei campioni di mRNA totale, abbiamo quantificato l'espressione del gene  $\beta$ -globinico utilizzando la tecnica della Real Time Quantitative PCR. Questa tecnica d'indagine si basa sull'emissione di fluorescenza dovuta alla degradazione di sonde nucleotidiche fluorescenti, che si legano a substrati di acido nucleico in modo sequenza-specifico. L'enzima impiegato è una particolare DNA polimerasi, prodotta dal batterio *Thermus aquaticus*, resistente alle temperature elevate e dotata di attività esonucleasica 5'-3', attraverso la quale rimuove e degrada la sonda appaiata al DNA target che incontra durante la fase di estensione sul filamento di DNA.

le sequenze utilizzate riconoscono il GAG del vettore

gagFAM-[FAM]ACAGCCTTCTGATGTTTCTAACAGGCCAGG[TAMRA]

gagF- GGAGCTAGAACGATTCGCAGTTA

gagR- GGTGTAGCTGTCCCAGTATTTGTC

### **Primer extension.**

Infine l'RNA estratto dai cloni Mel indotti è stato quantificato attraverso primer extension. (Primer extension System-AMV Reverse Transcriptase kit, Promega) Una tecnica usata per valutare la quantità di specifiche sequenze di RNA che viene effettuata marcando con radioattivo [ $^{32}\text{P}$ ]dATP oligonucleotidi specifici sia per le B-globine umane di origine lentivirale (5'-CAGTAACGGCAGACTTCTCCTC-3') sia per le B-globine murine (5'-TGATGTCTGTTTCTGGGGTTGTG-3') ci attendiamo frammenti di 90bp e 53bp rispettivamente. Questi primers sono poi fatti ibridizzare all'RNA ed utilizzati dalla trascrittasi inversa per trascrivere l'mRNA in cDNA che è stato poi analizzato su gel denaturante di poliacrilamide al 6%. L'intensità del segnale radioattivo di ogni banda è stata poi determinata attraverso l'analisi al Phosphorimager (Biorad) e i risultati sono stati rapportati al numero di copie di vettore.

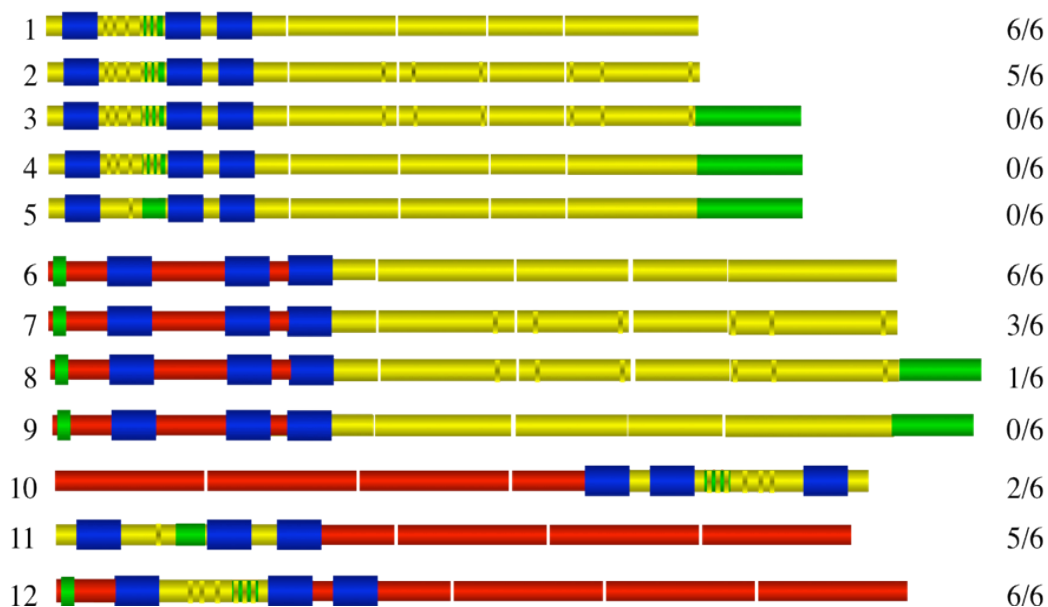
### **Analisi con Southern-blot del numero di copie di vettore**

Per analizzare il numero di copie di vettore integrate nelle cellule, il DNA estratto dai cloni è stato digerito con l'enzima ScaI e studiato tramite Southern blot [Sadelain 1995] usando come probe un frammento Nco-BamHI del gene B-globinico umano marcato con [ $^{32}\text{P}$ ]dCTP

In tutti i casi il numero di copie si ottiene normalizzando rispetto ad un controllo che nel nostro caso è un clone MEL derivato da singola cellula che contiene un singola copia di vettore.

## Risultati

N° di cloni MEL ottenuti per ogni costrutto



**Figura 15** – Schema del rapporto tra pool ottenuti e n° di trasduzioni per ogni costrutto-

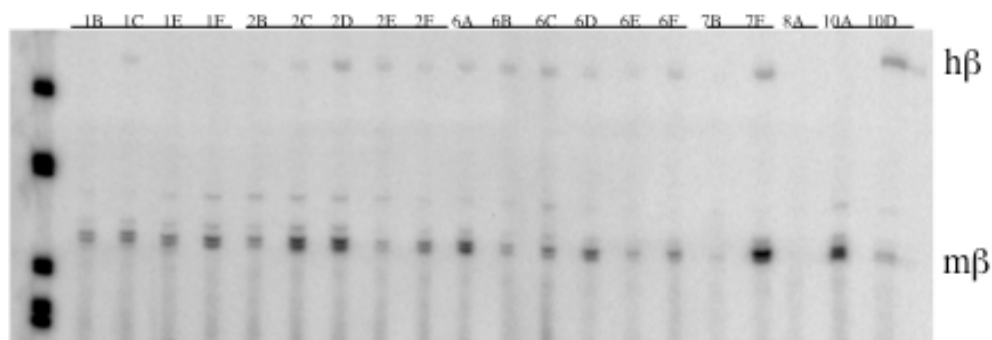
La figura 15 riporta il rapporto tra i pool ottenuti e il numero di trasduzioni fatte. Come si può notare i vettori contenenti l'ERV9 (vettori n°3, 4, 5, 8, 9) non hanno dato nessun pool, questo ad indicare una sua azione altamente destabilizzante sul titolo virale.

Il titolo dei vari vettori è ancora in corso di studio, ma a titolo puramente speculativo, si può ipotizzare, dal numero più elevato di pool di cloni MEL ottenuti, un maggior titolo del vettore CMPDOct.

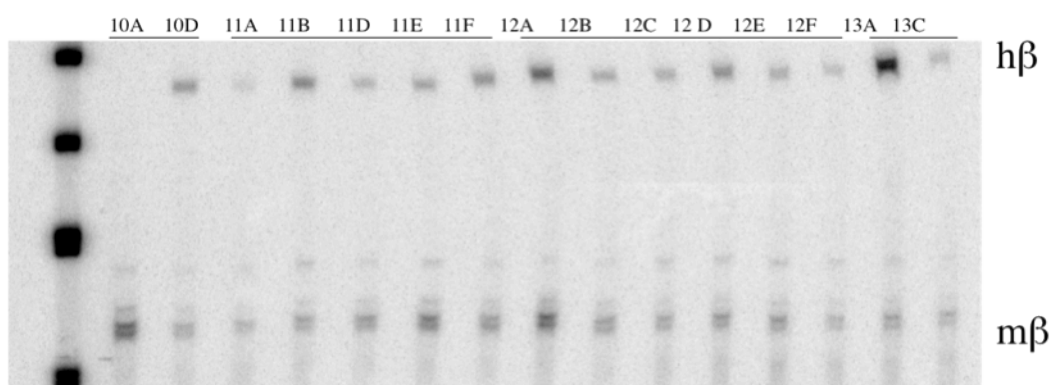
### Analisi dell'espressione dei diversi costrutti in pool di cellule MEL

L'RNA estratto dai cloni Mel indotti è stato quantificato attraverso primer extension, mandato su gel (Figura 16) e quantificato con Phosphorimager.

#### Primer extension gel

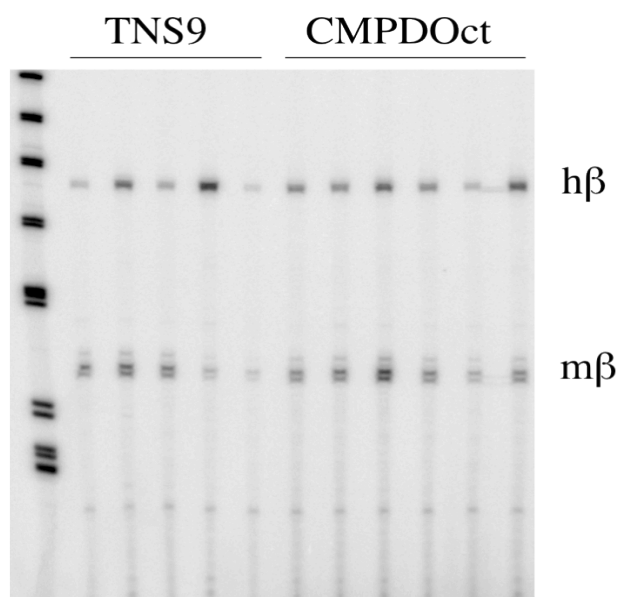


#### Primer extension gel2



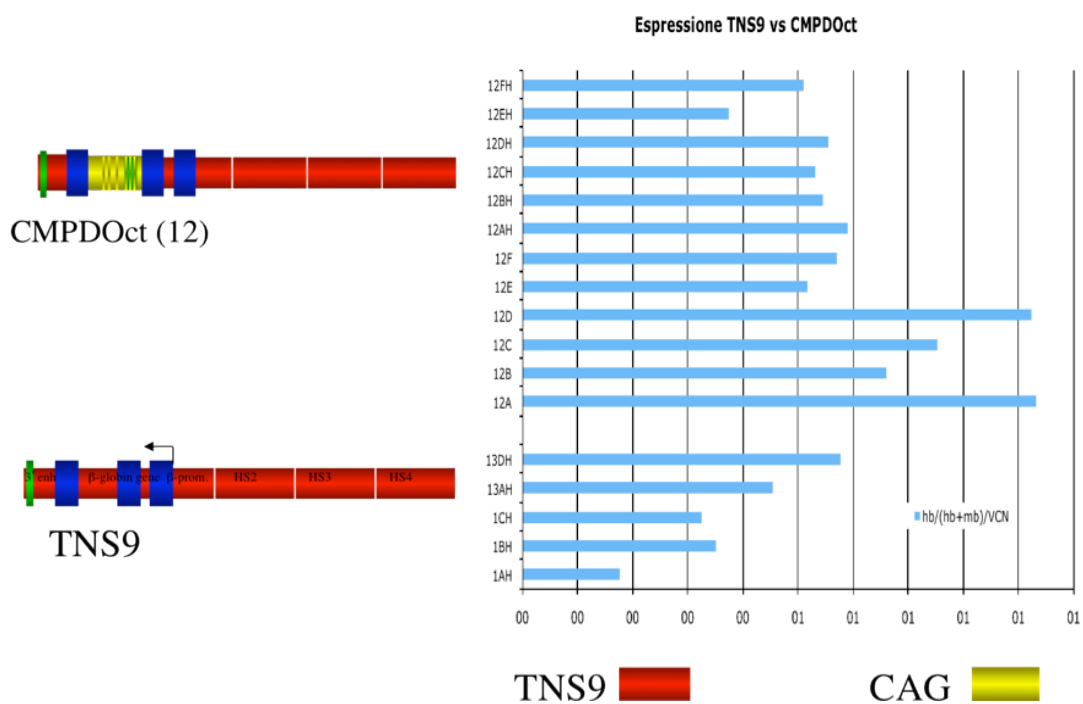
**Figura 16** - Primer extension.

Da questo esperimento risulta visivamente evidente che i costrutti n°6, n°11 e soprattutto n°12 sono quelli con l'espressione più alta del gene  $\beta$ -globinico umano. L'esperimento è stato quindi ripetuto per comparare e quantificare meglio l'espressione del TNS9 e del costrutto n°12 che noi abbiamo chiamato CMPDOct. I risultati sono mostrati in Figura 17



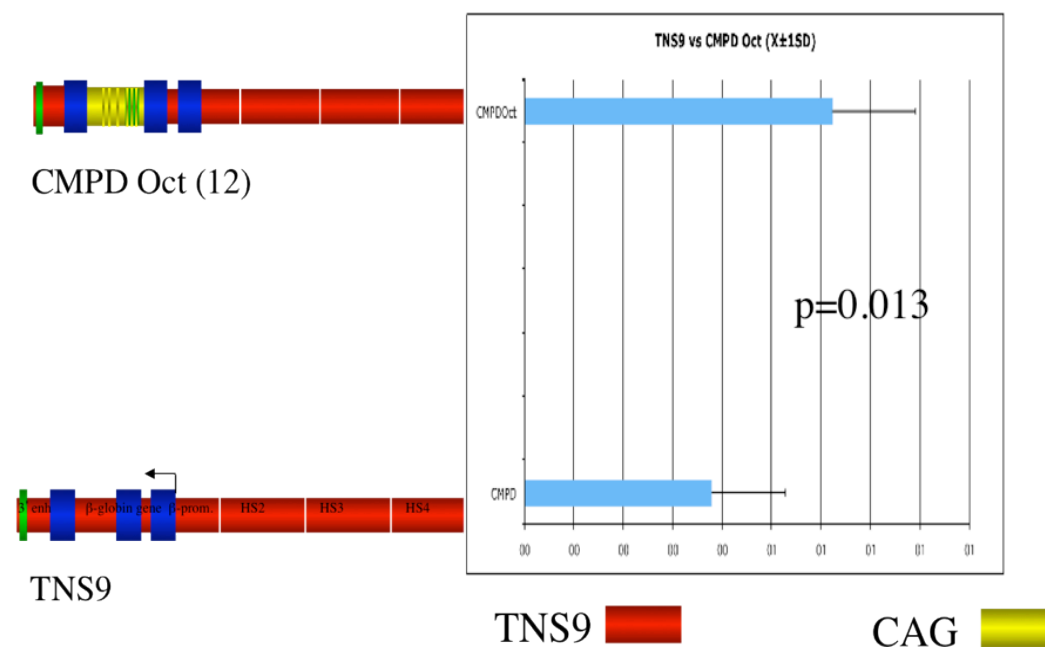
**Figura 17** - Esperimento di primer expression che compara l'espressione del CMPDOct con quella del vettore TNS9.

Quantificando l'intensità delle bande col Phosphorimager si evince che l'espressione del CMPDOct e del TNS9 è alta in ogni pool esaminato, tuttavia operando la correzione dell'espressione in rapporto al diverso numero di copie risulta che il vettore n°12 CMPDOct ha un'espressione più alta di circa il 25% rispetto al vettore di partenza TNS9 (figura 18 e 19).



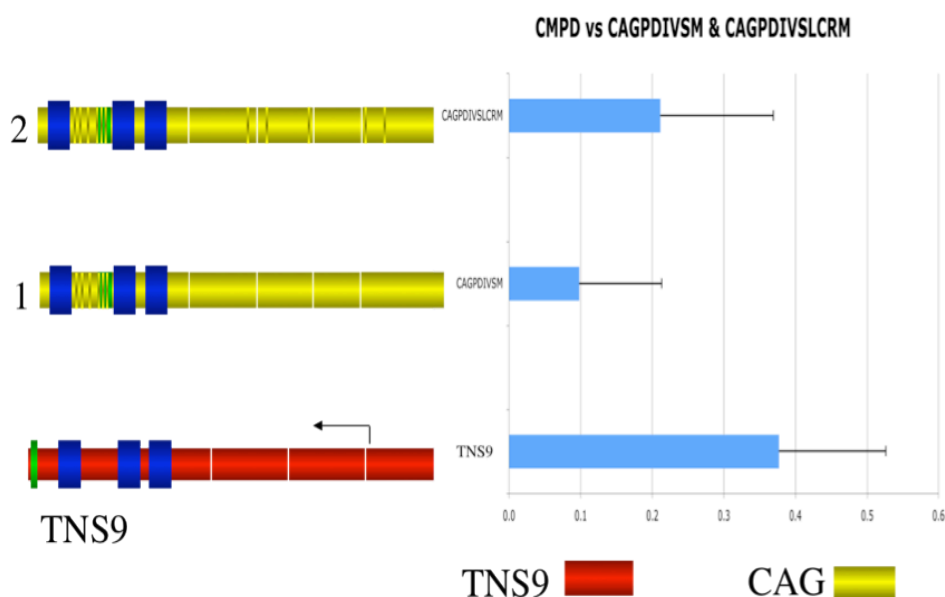
**Figura 18** – Espressione del CMPDOct e del TNS9.

### Media d'espressione



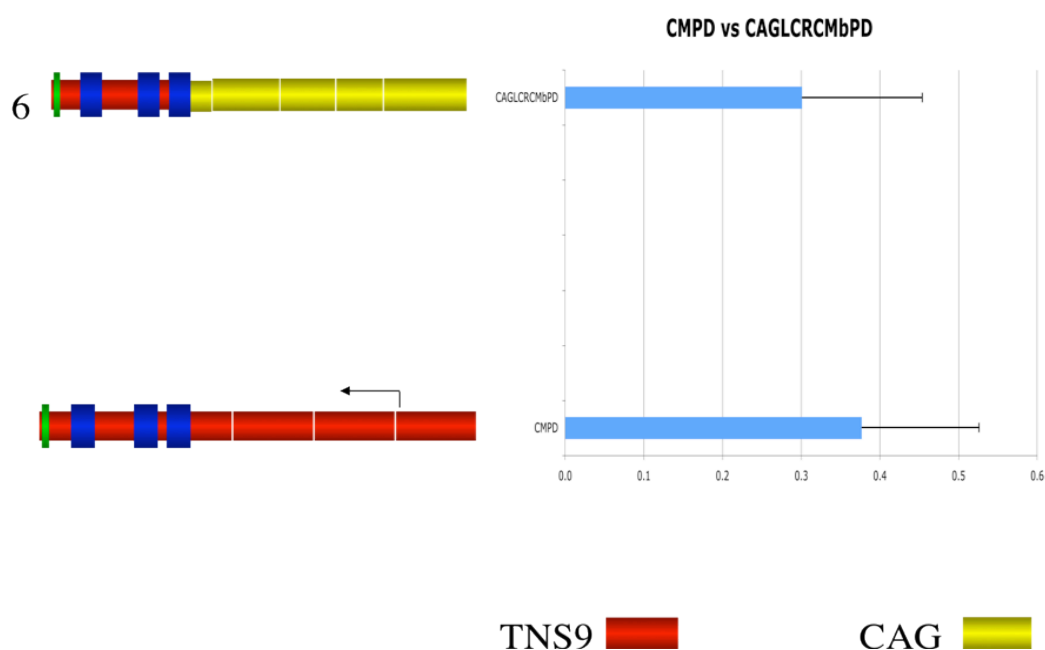
**Figura 19** – Medie d'espressione dei vettori CMPDOct e TNS9.

In [Figura 18](#) è riportata l'espressione dei vari pool di cloni CMPDOct rapportata a quella del TNS9. Mentre la [Figura 19](#) ne riporta le medie d'espressione significative ( $p$  value = 0,0139). Analizzando la variabilità dell'espressione tra i vari cloni appare evidente come il clone CMPDOct abbia meno variabilità rispetto al vettore di riferimento TNS9 suggerendo che l'espressione del vettore è meno dipendente dal sito di integrazione nel genoma cellulare. E' possibile che questo dato sia attribuibile alla presenza di alcuni siti SATB1 che agiscono come siti di acetilazione ostacolando l'invasione dell'eterocromatina.



**Figura 20 – Medie d'espressione dei costrutti n°1 e n°2.**

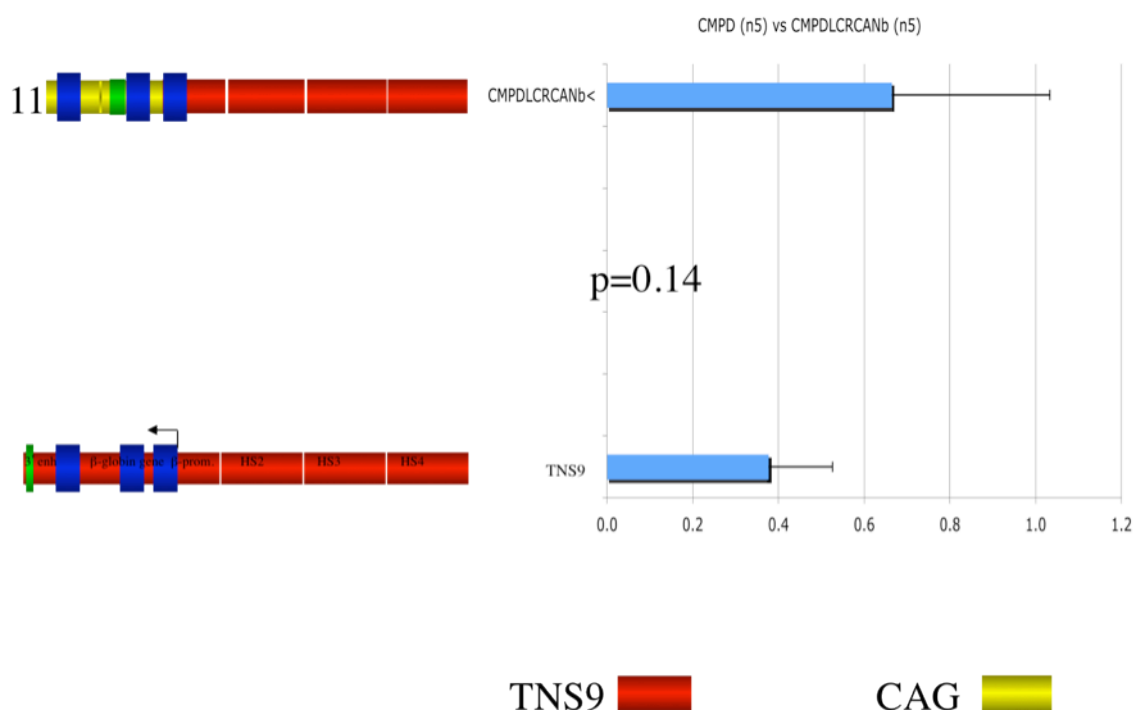
Dal confronto dell'espressione dei vettori n°1 e n°2 riportati in [Figura 20](#), che differiscono solo per la presenza di mutazioni di alcuni siti di poliadenilazione nel vettore 2, le mutazioni appaiono avere un effetto positivo migliorando di circa due volte l'espressione del vettore n°2.



**Figura 21 – Espressione del costrutto n°6.**



La [Figura 21](#) riporta l'espressione del costrutto n°6 e mostra l'effetto delle due diverse LCR sull'espressione globinici. Se pur di poco e in maniera non significativa osserviamo che la LCR del vettore TNS9 sembra essere più efficiente della LCR del vettore CAG nonostante esso contenga tutti e quattro i siti ipersensitivi



**Figura 22** – Espressione del costrutto n°11 rapportata a quella del vettore TNS9.

In [Figura 22](#) è riportata l'espressione del costrutto n°11 in cui è stata inserita l'IVS2 mutagenizzata del costrutto CAG. Il promotore e gli elementi della LCR sono invece quelli del costrutto di riferimento TNS9.

Questi risultati mostrano come la presenza dell'IVS2 svolga un ruolo determinante incrementando l'espressione di oltre il 30% rispetto all'espressione del vettore di riferimento..

## DISCUSSIONE

Dal nostro lavoro è evidente come l'introduzione nel vettore globinico del sito Oct-1 presente nell'IVS2 del gene  $\beta$ -globinico aumenti l'espressione del vettore del 25%. Questo risultato è in accordo con gli esperimenti su topi transgenici che indicavano un potenziamento dell'espressione di portata analoga nei costrutti contenenti il sito Oct1. Negli stessi esperimenti la reintroduzione dei siti GATA-1 eliminati dalla delezione Rsa1 era influente sui livelli d'espressione. Tuttavia, noi pensiamo di verificare anche in costrutti lentivirali se GATA-1 ha o meno un ruolo sull'espressione globinici. E' possibile, ad esempio, che essi influiscano sulla specificità dell'espressione globinica confinandola ai tessuti eritroide-specifici.

Oltre al miglioramento dell'espressione, il sito Oct sembra avere meno variabilità d'espressione rispetto al vettore di riferimento TNS9, suggerendo che l'espressione della cassetta sia meno dipendente dal sito di integrazione nel genoma cellulare.

Questo può essere dovuto alla presenza di siti MARs nella IVS2 che influenzano l'acetilazione della cromatina [Zheng 2012].

Dal rapporto tra pool selezionati e numero di trasduzioni con ogni costrutto si può ricavare una stima indiretta del titolo virale assumendo di non ottenere cloni quando il titolo virale è basso. In base a questa evidenza indiretta, la presenza dell'ERV9 sembra ridurre il titolo virale, mentre le mutazioni a livello dei segnali di poliadenilazione non influiscono negativamente sul titolo.

Inoltre dal confronto dell'espressione del costrutto 6 che differisce dal TNS9 esclusivamente per i frammenti costituenti la LCR risulta evidente come la LCR da noi assemblata sia meno efficace di quella del TNS9, mentre le mutazioni dei segnali di poliadenilazione sembrano avere un'effetto positivo sull'espressione del vettore.

La maggiore efficacia della LCR di TNS9 è verosimilmente attribuibile alla maggior estensione dei siti cruciali HS2 e HS3, effetto che era già stato osservato negli esperimenti di Sadelain in cui il vettore contenenti frammenti HS più piccoli era chiaramente meno efficace [May 2000].

I dati presentati sono indicativi di un miglioramento del vettore con le modifiche da noi apportate. La maggior efficacia di questi vettori dovrà essere confermata in esperimenti di trasduzione e di trapianto di cellule staminali in topi talassemici e in cellule CD34+ umane.

## BIBLIOGRAFIA

Aiuti A, Slavin S, Aker M, et al. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science*. 296:2410-2413, 2002.

Aiuti A, Vai S, Mortellaro A, et al. Immune reconstitution in ADA-SCID after PBL gene therapy and discontinuation of enzyme replacement. *Nat Med*. 8:423-425, 2002.

Bianco Silvestroni I. Le talassemie. Un problema medico-sociale: ieri e oggi. Istituto Italiano di Medicina Sociale, Roma, 1998.

Borgna-Pignatti C, Rugolotto S, De Stefano P, Zhao H, Cappellini MD, Del Vecchio GC, Romeo MA, Forni GL, Gamberini MR, Ghilardi R, Piga A, Cnaan A. Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine. *Haematologica*. 2004 Oct;89(10):1187-93.

Borgna-Pignatti C, Cappellini MD, De Stefano P, Del Vecchio GC, Forni GL, Gamberini MR, Ghilardi R, Piga A, Romeo MA, Zhao H, Cnaan A Cardiac morbidity and mortality in deferoxamine- or deferiprone-treated patients with thalassemia major. : *Blood*. 2005 Dec 22

Browning, M. T., Mustafa, F., Schmidt, R. D., Lew, K. A. & Rizvi, T. A. Sequences within the gag gene of feline immunodeficiency virus (FIV) are important for efficient RNA encapsidation. *Virus Res* 93, 199-209, 2003.

Bukrinsky, M. I., Haggerty, S., Dempsey, M. P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M. & Stevenson, M.. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* 365, 666-9, 1993.

Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*. 2000;288:669-672 Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L.. A third generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*, Vol 72, pp. 8463-8471, 1998.

Dillon N, Trimborn T, Strouboulis J, Fraser P, Grosveld F. The effect of distance on long-range chromatin interactions. *Mol Cell*, 1, 131-139, 1997  
 Dini G, Miano M, Morreale G, Lanino E. Transplantation of bone marrow from unrelated donors in Italy: activity and results. *Ann Ist Super Sanita*. 1999;35(1):7-11.

Dini G, Cancedda R, Giorgiani G, Porta F, Messina C, Uderzo C, Pession A, Fagioli F, La Nasa G, Arcese W, Pollichieni S, Zecca M, Lanino E, Mazzolari E, Cesaro S, Balduzzi A, Rondelli R, Vassallo E, Cappelli B, Locatelli F; Unrelated donor marrow transplantation in childhood: a report from the Associazione Italiana Ematologia e Oncologia Pediatrica (AIEOP) and the Gruppo Italiano per il Trapianto Midollo Osseo (GITMO) *Haematologica*. 2002 Aug;87(8 Suppl):51-7.

Efstratiadis A, Posakony JW, Maniatis T, Lawn RM, O'Connell C, Spritz RA, DeRiel JK, Forget BG, Weissman SM, Slightom JL, Blechl AE, Smithies O, Baralle FE, Shoulders CC, Proudfoot NJ. The structure and evolution of the human  $\beta$ -globin gene family. *Cell*, 21,653-668, 1980

Ellis J, Tan-Un KC, Harper A, Michalovich D, Yannoutsos N, Philipsen S, Grosveld F. A dominant chromatin-opening activity in 5' hypersensitive site 3 of the human beta-globin locus control region *EMBO J*. Feb 1;15(3):562-8, 1996.

Enver T, Ebens AJ, Forrester WC, Stamatoyannopoulos G. The human beta-globin locus activation region alters the developmental fate of a human fetal globin gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:7033-7037

Feng Z, Sun E, Lan H, Zhang C, Li Q, Zhu W. Unrelated donor bone marrow transplantation for beta-thalassemia major: an experience from China. *Bone Marrow Transplant*. 2006 Jan;37 (2):171-4.

Forrester WC, Fernández LA, Grosschedl R Nuclear matrix attachment regions antagonize methylation-dependent repression of long-range enhancer-promoter interactions *Genes Dev*. Nov 15;13(22):3003-14, 1999.

Grosveld F, Antoniou M, Berry M, De Boer E, Dillon N, Ellis J, Fraser P, Hanscombe O, Hurst J, Imam A, Lindenbaum M, Philipsen S, Pruzina S, Strouboulis J, Raguz-Bolognesi

S and Talbot D. The regulation of human globin gene switching. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 339, 183-191, 1993.

Hameau L, Jeusset J, Lafosse S, et al. Human immunodeficiency virus type 1 central dna flap: dynamic terminal product of plus-strand displacement dna synthesis catalyzed by reverse transcriptase assisted by nucleocapsid protein. *J Virol*. 75:3301-3313, 2001.

Hanscombe O, Whyatt D, Fraser P, Yannoutsos N, Greaves D, Dillon N, Grosveld F. Importance of globin gene order for correct developmental expression. *Genes Dev*, 5, 1387-1394, 1991

Harju S, J.McQueen KJ, Peterson KR. Chromatin structure and control of  $\beta$ -like globin gene switching. *Exp Biol Med*. 227, No.9, 683-700, 2002.

Henderson, B.R. , Percipalle, P. Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. *J Mol Biol* 274, 693-707, 1997.

Jane SM, Ney PA, Vanin EF, Gumucio DL, Nienhuis AW. Identification of a stage selector element in the human gamma-globin gene promoter that fosters preferential interaction with the 5' HS2 enhancer when in competition with the beta-promoter. *EMBO J*. 11, 2961-2969, 1992.

Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. Viral vector for gene therapy: the art of turning infectious agent into vehicles of therapeutics. *Nat Med*, Vol 116, pp. 33-40, 2001.

La Nasa G, Argioli F, Giardini C, Pession A, Fagioli F, Caocci G, Vacca A, DE Stefano P, Piras E, Ledda A, Piroddi A, Littera R, Nesci S, Locatelli F. Unrelated Bone Marrow Transplantation for  $\beta$ -Thalassemia Patients: The Experience of the Italian Bone Marrow Transplant Group. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Nov;1054:186-95

Li Q, Emery DW, Fernandez M, Han H, Stamatoyannopoulos G. Development of viral vectors for gene therapy of beta-chain hemoglobinopathies: optimization of a gamma-globin gene expression cassette. *Blood*. 93:2208-2216, 1999.

Long Q, Bengra C, Li C, Kutlar F, Tuan D. A long terminal repeat of the human endogenous retrovirus ERV-9 is located in the 5' boundary area of the human beta-globin locus control region. *Genomics*. 1998;54:542-555

Luis A. Fernández, Michael Winkler, and Rudolf Grosschedl Matrix Attachment Region-Dependent Function of the Immunoglobulin  $\mu$  Enhancer Involves Histone Acetylation at a Distance without Changes in Enhancer Occupancy *Molecular And Cellular Biology*, Jan. P. 196–208, 2001.

May C, Rivella S, Callegari J, Heller G, Gaensler KM, Luzzatto L, Sadelain M. Therapeutic haemoglobin synthesis in beta-thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human beta-globin. *Nature*. 2000 Jul 6;406(6791):82-6.

Myers, Maniatis Fine structure genetic analysis of a beta-globin promoter. *Science*, 232, 613-618, 1986.

Naldini, L., Blomer, U., Gally, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M. & Trono, D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-7, 1996.

Orkin Stuart H., Regulation of globin gene expression in erythroid cells. *Eur. J. Biochem*. 231, 271-281, 1995.

Ostermeier GC, Liu Z, Martins RP, Bharadwaj RR, Ellis J, Draghici S, Krawetz SA. Nuclear matrix association of the human beta-globin locus utilizing a novel approach to quantitative real-time PCR *Nucleic Acids Res*. Jun 15;31(12):3257-66, 2003.

Parolin C, Dorfman T, Palù G, Göttlinger H, Sodroski J.. Analysis in human immunodeficiency virus type 1 vectors of cis-acting sequences that affect gene transfer into human lymphocytes. *J Virol*, Vol 68, pp. 3888-3895, 1994.

Pawliuk R, Westerman KA, Fabry ME, et al. Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy. *Science*. 294:2368-2371, 2001.

Qiliang Li, Peterson KR, Xiangdong Fang, Stamatoyannopoulos G. Locus control regions. *Blood*, 100 (9), 3077-3086, 2002.

Reuben R. C., Wife R. L., Breslow R., Rifkind R.A., Marks P.A.. A new group of potent inducers of differentiation in murine erythroleukemia cells. *Proc Nat. Acad. Sci. USA Cell Biology* Vol.73 N°3 pp862-866, 1976.

Rikki R. Bharadwaj, Cecelia D. Trainor, Peter Pasceri, and James Ellisj LCR-regulated transgene expression levels depend on the Oct-1 site in the AT-rich region of  $\beta$ -globin intron-2 *Blood*, 15 February 2003 Volume 101, Number 4, 2003.

Rivella S, May C, Chadburn A, Riviere I, Sadelain M. A novel murine model of Cooley anemia and its rescue by lentiviral-mediated human beta-globin gene transfer. *Blood*. 101:2932-2939, 2003.

Sadelain M. Globin. Gene transfer for the treatment of severe hemoglobinopathies: a paradigm for stem cell-based gene therapy. *J Gene Med*. 4:113-121, 2002.

Sadelain M., Wang C.H.J., Grosveld F., Mulligan R.C.. Generation of a high-titer retroviral vector capable of expressing high levels of the human beta globin gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92, 6728-6732, 1995.

Savada D., Orians G.H., Heller H. C.. *Biologia - L'informazione e l'eredità*. Zanichelli 2005.

Srinivasakumar N. HIV-1 vector systems. *Somat Cell Mol Gen*, Vol 26, pp. 51-81, 2001.

VandenDriessche T, Thorrez L, Naldini L, et al. Lentiviral vectors containing the human immunodeficiency virus type-1 central polypurine tract can efficiently transduce nondividing hepatocytes and antigen-presenting cells in vivo. *Blood*. 100:813-822, 2002.

Williams DA, Baum C. Medicine. Gene therapy--new challenges ahead. *Science*. Oct 17;302 5644:400-1 2003

Zheng Xue, Xiang Lv, Wei Song, Xing Wang, Guang-Nian Zhao, Wen-Tian Wang, Jian Xiong, Bei-Bei Mao, Wei Yu, Ben Yang, Jie Wu, Li-Quan Zhou, De-Long Hao, Wen-Ji Dong, De-Pei Liu and Chih-Chuan Liang SIRT1 deacetylates SATB1 to facilitate MAR HS2-MAR interaction and promote e-globin expression. *Nucleic Acids Research*, 1–12, 2012.



---

Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. J Virol, Vol 72, pp. 9873-9880, 1998.